



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



MESTRADO EM PARASITOLOGIA MÉDICA

**Estudo da expressão de genes de aminopeptidase de
Anopheles gambiae após refeição infectante por
*Plasmodium berghei***

Carlos José Pimenta Bernardes

2008



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



**Estudo da expressão de genes de aminopeptidase de
Anopheles gambiae após refeição infectante por
*Plasmodium berghei***

Carlos José Pimenta Bernardes

Tese apresentada para a obtenção do grau de
Mestre em Parasitologia Médica

Orientadores:

Professor Doutor Paulo Almeida
Unidade de Entomologia Médica, IHMT

Professor Doutor Henrique Silveira
Unidade de Malária, IHMT

2008

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente ao Prof. doutor Paulo Almeida e ao Prof. doutor Henrique Silveira pela orientação do trabalho, pela disponibilidade que tiveram ao longo de dois anos para me ajudar, e pela generosidade com que partilharam comigo os seus conhecimentos.

Um agradecimento aos meus Professores do IHMT por todas as “lições” dadas nestes últimos anos, especialmente ao Prof. António Grácio, à Prof. Maria Amélia e ao Prof. Virgílio do Rosário.

Um muito obrigado aos meus colegas e amigos que me acompanharam na Entomologia: Ferdi, Ricardo, Nuno e Ana e também à Carla e à Teresa. Um beijinho muito especial também para a D. Sílvia.

Um muito obrigado aos meus colegas e amigos da Malária: Zé, Patrícia, Bruno, Louise, Sofia, Natália, Paula, Adilson, Zoraima e Felipe e também à Dinora, Fátima e Catarina.

Um agradecimento muito especial às três pessoas que, sem esperar nada em troca, tornaram este trabalho possível. Um grande beijinho para a Rute, a Cristina e a Diara.

Muito obrigado aos meus pais e à minha irmã. Obrigado por me deixarem ser feliz e me aturarem quando eu sou emburrante e acho que tenho sempre razão, por ser cientista.

Obrigado Daniela. És a minha paz depois da guerra.

Índice

Agradecimentos

Índice

Índice de figuras

Índice de tabelas

Lista de abreviaturas

| | |
|---|----|
| Resumo | 1 |
| Abstract | 1 |
| Introdução | 2 |
| 1) Malária | 2 |
| 2) Parasita | 2 |
| 2.1) Ciclo de vida | 3 |
| 2.2) Terapias antimaláricas | 4 |
| 3) Vector | 5 |
| 3.1) Ciclo de vida | 6 |
| 3.2) Transmissão de doenças e importância médica | 7 |
| 3.3) Digestão no mosquito | 8 |
| 3.4) Influência da digestão da refeição sanguínea nos mosquitos, na infecção pelos parasitas da malária | 9 |
| 3.5) Alimentação Artificial | 10 |
| 4) Aminopeptidases | 11 |
| 4.1) Aminopeptidases no mosquito | 11 |
| Objectivos | 13 |
| Material e Métodos | 14 |
| 1) Manutenção das colónias de <i>Anopheles gambiae</i> e <i>Anopheles stephensi</i> | 14 |

| | |
|--|----|
| 2) Manutenção do ciclo de vida do parasita de malária de roedor <i>Plasmodium berghei</i> em laboratório..... | 15 |
| 3) Infecção de mosquitos com <i>Plasmodium berghei</i> , por alimentação artificial de cultura de oocinetos ou por alimentação natural em murganhos infectados | 16 |
| 3.1) Alimentação Artificial (AA) de mosquitos por membrana..... | 17 |
| 3.2) Alimentação natural (AN) em murganhos infectados..... | 18 |
| 4) Extracção de RNA..... | 19 |
| 4.1) 1º protocolo de extracção | 19 |
| 4.2) 2º protocolo de extracção | 19 |
| 4.3) 3º protocolo de extracção | 20 |
| 5) Quantificação de expressão de aminopeptidases por Polimerase Chain Reaction em tempo real quantitativa (qRT-PCR)..... | 20 |
| 5.1) Síntese de DNA complementar | 20 |
| 5.2) Desenho dos primers | 21 |
| 5.3) Preparação da curva padrão de DNA de <i>Anopheles gambiae</i> | 22 |
| 5.4) Quantitive Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR): | 22 |
| 6) Análise de resultados..... | 23 |
| Resultados | 25 |
| 1) Infecção de mosquitos por alimentação artificial de oocinetos de <i>Plasmodium berghei</i> e por alimentação em murganhos infectados | 25 |
| 1.1) Alimentação Artificial (AA) em membrana..... | 25 |
| 1.2) Alimentação Natural em murganhos (AN) | 26 |
| 2) Extracção de RNA..... | 26 |
| 2.1) 1º protocolo de extracção | 26 |
| 2.2) 2º protocolo de extracção | 27 |

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| 2.3) 3º protocolo de extracção | 28 |
| 3) Análise de resultados..... | 29 |
| 3.1) Variação de expressão | 29 |
| Discussão e Conclusões..... | 36 |
| Bibliografia..... | 42 |
| Anexos..... | 46 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| 1) Representação esquemática do ciclo de vida do parasita da malária | 3 |
| 2) Representação esquemática do ciclo de vida de um mosquito Anofelíneo | 6 |
| 3) Exemplo do gráfico de uma curva padrão obtido por qRT-PCR. Logaritmo do factor de diluição em função do C _T (threshold cycle) | 23 |
| 4) Variação ao longo do tempo da expressão do gene AGAP005728 de <i>An. gambiae</i> após refeição sanguínea infectante e não infectante | 30 |
| 5) Aumento/diminuição da expressão do gene AGAP005728 em relação à expressão no tempo 0 (não alimentados) | 30 |
| 6) Variação ao longo do tempo da expressão do gene AGAP003077 de <i>An. gambiae</i> após refeição sanguínea infectante e não infectante..... | 31 |
| 7) Aumento/diminuição do logaritmo da expressão do gene AGAP003077 em relação à expressão no tempo 0 (não alimentados) | 31 |
| 8) Variação ao longo do tempo da expressão do gene AGAP003695 (primeiro par de primers) de <i>An. gambiae</i> após refeição sanguínea infectante e não infectante..... | 32 |
| 9) Aumento/diminuição do logaritmo da expressão do gene AGAP003695 (primeiro par de primers) em relação à expressão no tempo 0 (não alimentados) | 32 |
| 10) Variação ao longo do tempo da expressão do gene AGAP003695 (segundo par de primers) de <i>An. gambiae</i> após refeição sanguínea infectante e não infectante..... | 33 |
| 11) Aumento/diminuição do logaritmo da expressão do gene AGAP003695 (segundo par de primers) em relação à expressão no tempo 0 (não alimentados) | 33 |
| 12) Variação ao longo do tempo da expressão do gene AGAP000885 de <i>An. gambiae</i> após refeição sanguínea infectante e não infectante..... | 34 |
| 13) Aumento/diminuição do logaritmo da expressão do gene AGAP000885 em relação à expressão no tempo 0 (não alimentados) | 34 |

Índice de tabelas

| | |
|---|----|
| 1) Localização dos genes estudados no genoma de <i>Anopheles gambiae</i> , correspondentes à família ENSF00000001133, Aminopeptidase | 21 |
| 2) Representação dos primers forward e reverse para os genes da família aminopeptidase de <i>Anopheles gambiae</i> | 21 |
| 3) Número de intestinos médios dissecados em cada experiência de alimentação artificial | 25 |
| 4) Número de intestinos médios dissecados em cada experiência de alimentação natural | 26 |
| 5) Absorvância, rácio e concentração de RNA das amostras correspondentes às zero, três e seis horas após a refeição sanguínea da alimentação artificial 1 | 27 |
| 6) Absorvância, rácio e concentração de RNA das amostras correspondentes às zero, três e seis horas após a refeição sanguínea da alimentação artificial 3 | 27 |
| 7) Absorvância, Rácio e Concentração de RNA das amostras correspondentes às zero, doze, dezoito e vinte e quatro horas após a refeição sanguínea, da alimentação natural I | 27 |
| 8) Absorvância, Rácio e Concentração de RNA das amostras correspondentes às zero, doze, dezoito e vinte e quatro horas após a refeição sanguínea das alimentações naturais II e III | 28 |
| 9) Absorvância, rácio e concentração de RNA das amostras correspondentes às zero, três e seis horas após a refeição sanguínea da alimentação artificial 4 | 28 |

Lista de abreviaturas

A.A. (Alimentação Artificial)

A.N. (Alimentação Natural)

cDNA (complementary DNA) – DNA complementar

Ct (threshold cycle) – ciclo de limiar no qRT-PCR

DNA (Deoxyribonucleic acid) - Ácido desoxirribonucleico

DNAse – enzima desoxirribonuclease

dNTP's - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

MMLV-RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase) – enzima de transcriptase reverse

PABA (4-aminobenzoic acid) - ácido 4-aminobenzoico

PBS (Phosphate saline buffer) - solução salina de tampão de fosfato

qRT-PCR (quantitative real-time PCR) – pcr em tempo real quantitativo

RNA (Ribonucleic acid) - Ácido ribonucleico

Resumo

Neste estudo é analisada a expressão de 4 genes de aminopeptidase de mosquito *Anopheles gambiae* após uma refeição sanguínea infectante ou não infectante, pelo parasita da malária de roedor *Plasmodium berghei*. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores de expressão dos genes após a refeição sanguínea, nem entre os valores de expressão da refeição infectante e não infectante. Uma análise da totalidade dos genes da família aminopeptidase de *An. gambiae* seria pertinente para uma compreensão total da influência destas enzimas na invasão do epitélio do mosquito pelo plasmódio.

Abstract

In this study we analyse the expression alterations of 4 *Anopheles gambiae* mosquito aminopeptidases, following an infective and non infective bloodmeal by the murine malaria parasite *Plasmodium berghei*. No statistically significant differences were observed on the expression values after the blood meal, nor on the expression values of the infective and non-infective bloodmeal. Further analysis of the complete aminopeptidase family would be important for a full comprehension of the part these enzymes play in mosquito gut invasion by plasmodium.

Introdução

1) Malária

A malária é uma doença causada por protozoários do género *Plasmodium*, sendo uma das principais causas de morbilidade em crianças e adultos nos países tropicais. Tem uma mortalidade estimada em mais de 1 milhão de óbitos por ano, na sua maioria crianças menores de 5 anos. Existem presentemente 109 países endémicos desta doença, 45 dos quais se situam na região africana. Estes parasitas são inoculados no Homem por mosquitos infectados do género *Anopheles* (WHO 2008).

O controlo da malária no terreno requer um programa de combate multidisciplinar que combine o controlo dos mosquitos vectores e o tratamento com fármacos antimaláricos apropriados, não descurando, no entanto, a importância vital da investigação laboratorial como ferramenta indispensável nos progressos, realizados e a realizar, na luta contra este agente infeccioso.

2) Parasita

A malária humana é causada por protozoários do género *Plasmodium*, com quatro espécies infecciosas para o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malarie* (Nchinda 1998). O *P. falciparum* é a espécie considerada mais letal, por apresentar maiores níveis de mortalidade e morbilidade. A infecção por este parasita progride para anemia grave e malária cerebral (Guiyedi *et al.* 2007). O *P. berghei* é uma das espécies de parasita de malária que infectam mamíferos roedores, mas não seres humanos, sendo uma das quatro espécies de malária murina descritas na África Ocidental (Carter and Diggs 1977). Este tipo de parasitas tem a grande vantagem de serem análogos à malária humana em termos de estrutura, fisiologia e ciclo de vida (Carter and Diggs 1977), constituindo bons modelos animais de estudo laboratorial.

2.1) Ciclo de vida

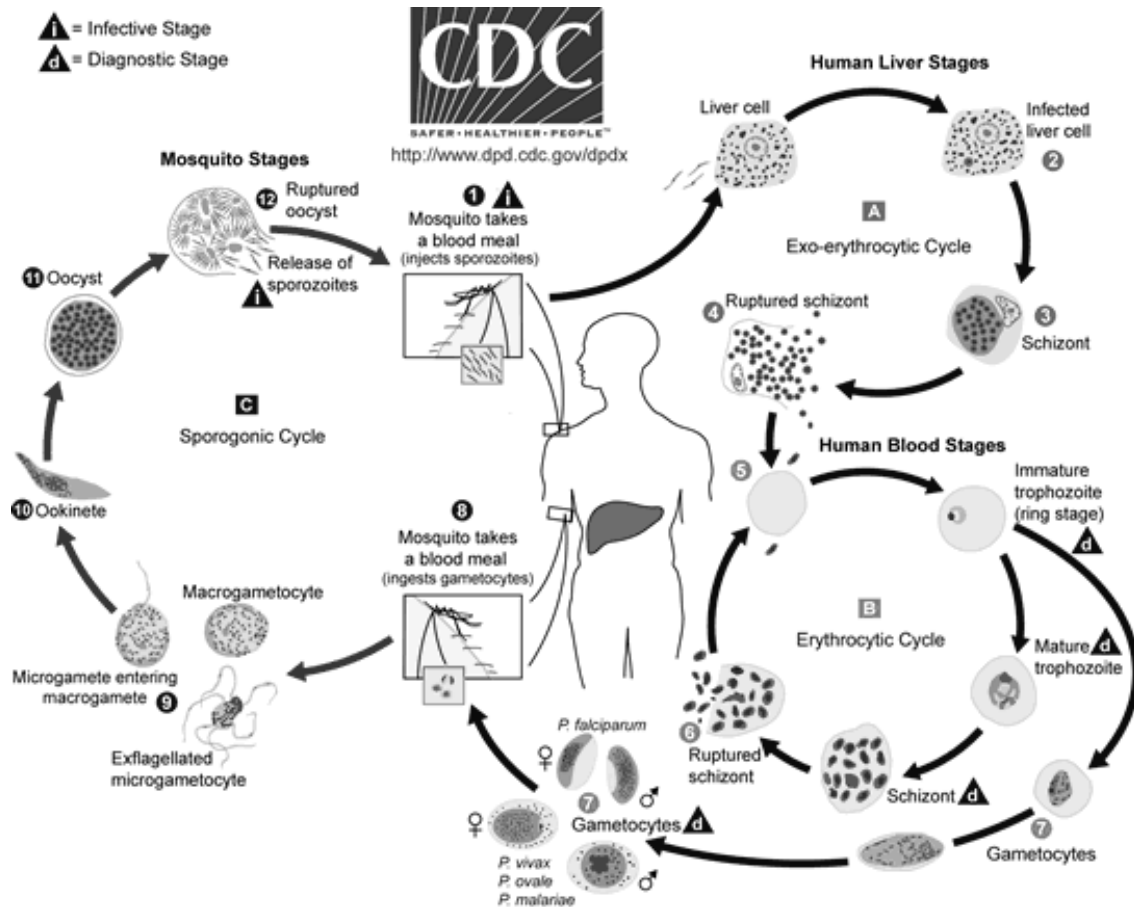


Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de vida do parasita da malária, www.cdc.gov

O ciclo de vida do parasita da malária (*Plasmodium spp*) envolve dois hospedeiros, sendo um deles obrigatoriamente um mosquito (Figura 1). Os micro e macrogametócitos são ingeridos pelas fêmeas dos mosquitos anofelíneos durante a refeição sanguínea num hospedeiro infectado, assim se inicia a fase esporogónica do ciclo de vida. No intestino do mosquito, os microgametócitos entram em exflagelação e fundem-se com os macrogametócitos, formando o zigoto, e este, por sua vez, transforma-se num oocineto móvel cerca de 20 horas após a refeição sanguínea. Os oocinetos migram para o exterior do bolo alimentar, penetram no epitélio celular do intestino médio e, ao atingirem o espaço entre o epitélio intestinal e a lâmina basal, transformam-se em oocistos (Sinden 2002). Ocorre então a esporogonia e no oocisto formam-se os esporozoítos que, após romperem a cápsula do oocisto, migram até às

glândulas salivares do mosquito (Sinden 2002). Uma vez nas glândulas salivares, os esporozoítos vão ser libertados juntamente com a saliva do mosquito e injectados na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado em que o mosquito infectado se alimentar (Carter e Diggs 1977). Os esporozoítos deslocam-se na corrente sanguínea do novo hospedeiro até ao fígado, infectam as células hepáticas e entram em maturação até se tornarem esquizontes, estes esquizontes maturam e rompem libertando os merozoítos. Concluída a fase hepática do ciclo de vida do parasita, inicia-se a fase eritrocitária, que consiste na reprodução assexuada do parasita nos glóbulos vermelhos. Os merozoítos penetram nos eritrócitos formando os trofozoitos e transformam-se em esquizontes eritrocíticos, que maturam e rebentam libertando mais merozoítos para a circulação sanguínea. Alguns dos merozoítos diferenciam-se em gametócitos que, após serem ingeridos pelos mosquitos, completam o ciclo (Service 1980; Rodriguez *et al.* 2002).

2.2) Terapias antimaláricas

O desenvolvimento dos plasmódios no mosquito e no Homem envolve uma série de passos críticos que podem ser explorados, de maneira a interromper a infecção pelo protozoário. Fármacos antimaláricos são utilizados para tratamento dos doentes infectados nas fases eritrocíticas, como a cloroquina e o quinino, e também nas fases exoeritrocíticas, como a primaquina, apenas nomeando algumas. Um dos problemas associados aos fármacos antimaláricos é o desenvolvimento de resistências por parte dos parasitas, que resulta em parte de alterações genéticas dos plasmódios por pressão selectiva (Bogitsh and Cheng 1998). Para além da pesquisa em terapia química, têm sido feitos esforços para desenvolver uma vacina contra a malária. Os principais tipos de vacinas que estão a ser desenvolvidos são vacinas anti-esporozoíticas, vacinas anti-fase eritrocítica e vacinas de bloqueio de transmissão (Bogitsh and Cheng 1998). Esta última vai depender em grande parte do silenciamento de genes e proteínas no

mosquito, e na interrupção da transmissão do parasita. As pesquisas vêm sendo dirigidas sobretudo aos oocinetos quando penetram o epitélio intestinal do mosquito, por esta fase ser mais vulnerável ao “bloqueio” do parasita (Carter 2001).

3) Vector

Os mosquitos são dos mais, senão os mais, importantes artrópodes vectores de doenças humanas. A manutenção no meio ambiente dos agentes que causam malária, filariose linfática e inúmeras infecções arbovirais, é totalmente dependente da presença de mosquitos que sejam vectores competentes na sua transmissão (Beerntsen *et al.* 2000). Torna-se assim imprescindível, não só conhecer as características fisiológicas e bio-ecológicas dos mosquitos vectores de uma determinada região, como também saber utilizar estes conhecimentos no seu combate e/ou controlo.

Entre os mais importantes vectores de malária encontra-se a espécie *Anopheles gambiae*, membro do complexo de espécies com o mesmo nome. Este complexo é formado por 7 espécies gémeas, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles bwambae*, *Anopheles gambiae sensu stricto*, *Anopheles melas*, *Anopheles merus*, *Anopheles quadriannulatus*, e *Anopheles quadriannulatus* sp. B, (Besansky *et al.* 1994; Coetzee *et al.* 2000; Ndiath *et al.* 2008) todas elas, excepto os *An. quadriannulatus*, envolvidas na transmissão dos parasitas de malária humana, estando demonstrado no entanto que estes últimos são susceptíveis ao *P. falciparum* em laboratório (Takken *et al.* 1999).

3.1) Ciclo de vida

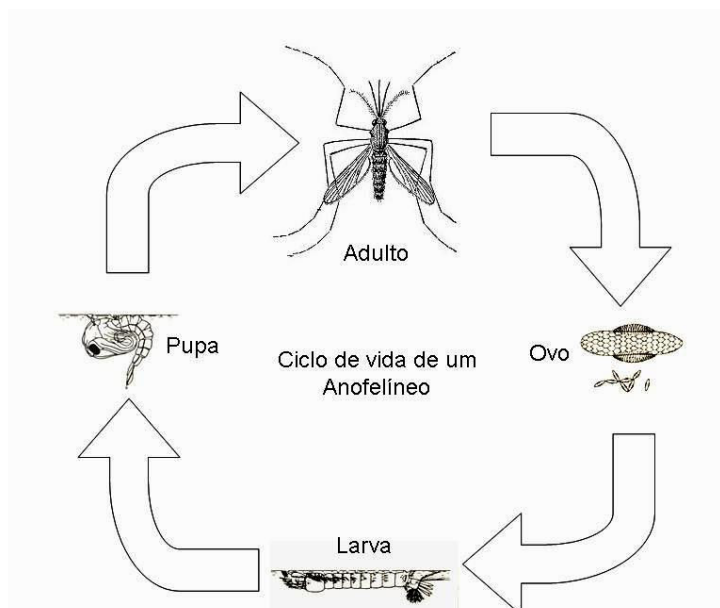


Figura 2 – Representação esquemática do ciclo de vida de um mosquito Anofelíneo, adaptado de www.cdc.gov e de imagens de A.J. Santos Grácio

O ciclo de vida dos mosquitos em geral compõe-se por 4 fases: Ovo, larva, pupa e adulto (Figura 2). Sendo que três quartos do ciclo de vida se passa na água, é fácil denotar a importância que os corpos de água parada têm no ciclo de vida e no controle da reprodução de mosquitos vectores de doença.

No caso dos mosquitos anofelíneos, aos quais pertence o *An. gambiae*, o ciclo de vida tem características que o demarcam dos outros culicídeos (Figura 2). Os ovos são colocados individualmente e possuem um par de flutuadores na zona lateral, as larvas não possuem sifão e colocam-se numa posição paralela à superfície da água e, nos adultos, ambos os sexos apresentam palpos longos de tamanho semelhante ao probóscis (Service 1980).

3.2) Transmissão de doenças e importância médica

Os anofelíneos são os únicos mosquitos com capacidade para transmitir malária humana, enquanto que a malária de aves é transmitida principalmente por mosquitos dos géneros *Aedes* e *Culex* (Gass and Yeates 1979). Esta exclusividade é importante nas estratégias de controlo de malária pois estas dependem, entre outros factores, dos níveis de cruzamento e isolamento filogenético das espécies pertencentes ao género *Anopheles* (Besansky *et al.* 1994).

O envolvimento dos mosquitos na transmissão da malária depende de características bióticas, como a procura de hospedeiros e voracidade com que se alimentam, os locais preferenciais de repouso e oviposição, e também de características abióticas, como os factores climáticos. A estas variáveis ainda se torna necessário adicionar, para compreender a transmissão da malária, factores relacionados com a biologia dos parasitas.

A capacidade de uma espécie de mosquito servir como vector de doença é definida em parte pelo entendimento dos conceitos de “capacidade vectorial” e “competência vectorial”. A capacidade vectorial dos anofelíneos é definida como “o número de potenciais novas infecções produzidas”, ou o número de contactos potencialmente infectantes que uma população de vectores é capaz de produzir a partir de uma pessoa doente por dia (Wernsdorfer and McGregor 1988; Beerntsen *et al.* 2000). A competência vectorial, como componente da capacidade vectorial, é regulada por factores genéticos intrínsecos ao mosquito, que têm influência na sua capacidade de transmitir um patógeno. É “a razão entre o número de fêmeas de mosquito que se alimentam de um hospedeiro infectado e se infectam”, transmitindo o parasita, “e o número de fêmeas que não consegue ter sucesso em transmitir a infecção”, por não se infectar ou não transmitir. Por exemplo, a preferência de hospedeiro e componentes

genéticas de susceptibilidade a um patógeno influenciam a competência vectorial (Beerntsen *et al.* 2000). Estes parâmetros de medição são da maior importância na epidemiologia da malária numa dada região, pois permitem definir as espécies de mosquitos contra as quais devem ser direccionadas eventuais campanhas de controlo de vectores (Afrane *et al.* 2008; Silver 2008)

3.3) Digestão no mosquito

Os mosquitos machos alimentam-se sobretudo de compostos açucarados de plantas, mas o interesse científico da alimentação de mosquitos recai sobretudo em caracterizar a hematofagia das fêmeas. A refeição sanguínea é essencial para os mosquitos iniciarem o ciclo de produção de ovos. Em condições de laboratório (25°C de temperatura, 80% de humidade, ciclo de 12 horas luz/escuridão e solução de açúcar disponível), necessitam de cerca de 48 horas para processar a refeição sanguínea e efectuar as posturas (Dana *et al.* 2005).

A digestão sanguínea nos mosquitos envolve uma série de eventos biológicos complexos, incluindo a formação da matriz peritrófica, a digestão da refeição de sangue, o desenvolvimento dos ovos e a excreção dos produtos da digestão. Ao efectuar a refeição é estimulada a secreção de enzimas digestivas do intestino e aumenta a sua actividade proteolítica. As enzimas responsáveis pela actividade proteolítica são as tripsinas e quimiotripsinas, as glucosidades e as aminopeptidases (Gass and Yeates 1979; Billingsley and Hecker 1991; Muller *et al.* 1993; Dana *et al.* 2005).

Além das grandes alterações fisiológicas, a alimentação também produz alterações morfológicas nos mosquitos. O epitélio intestinal é distendido e é secretada uma matriz peritrófica através de vesículas granulares presentes na parte apical das células do epitélio. A matriz peritrófica é um conjunto de membranas que separam a

refeição do mosquito do epitélio assim, desempenha um papel importante na biologia dos mosquitos, ao funcionar como uma membrana semipermeável que regula a passagem de moléculas entre as membranas intestinais (Richards and Richards 1977; Lehane 1997). Em *An. gambiae* a matriz pode ser observada 12 horas após a refeição e está completamente formada às 48 horas (Feldmann *et al.* 1990; Lemos *et al.* 1996; Dana *et al.* 2005).

3.4) Influência da digestão da refeição sanguínea nos mosquitos, na infecção pelos parasitas da malária

Para se transmitir com sucesso aos mosquitos, os parasitas da malária têm de passar por três potenciais barreiras no intestino médio: a matriz peritrófica; o epitélio celular do intestino, com a sua membrana apical e basolateral, e a lâmina basal que o rodeia. O parasita tem também de ter a capacidade de se evadir dos mecanismos de resposta imune dos próprios mosquitos e da actividade das enzimas digestivas secretadas durante o processo digestivo. Estas enzimas secretadas pelo intestino médio podem afectar a sobrevivência dos parasitas ingeridos e podem danificar os parasitas e inibir o seu desenvolvimento, durante os estádios iniciais do ciclo esporogónico (Sinden 2002). Foi já documentado que a adição de enzimas digestivas de mosquito a culturas de oocinetos de *P. berghei* inibe o desenvolvimento dos mesmos (Rodriguez *et al.* 2002). No caso da matriz peritrófica os parasitas da malária, ao contrário de outros patogénios, atravessam esta barreira depois da mesma estar completamente formada, o que leva a que fiquem retidos nesta matriz em número elevado (Leane and Billingsley 1996; Jahan *et al.* 1999). O epitélio intestinal apresenta uma barreira à infecção devido à presença de um factor lítico, que é responsável pela refractoriedade de *An. gambiae* em relação ao parasita avícola *P. gallinaceum* (Leane and Billingsley 1996). Os parasitas

também podem ser encapsulados por melanização, no espaço entre a membrana basolateral do epitélio e a lâmina basal. O parasita atravessa o epitélio intestinal mas é neutralizado quando inicia a formação do oocisto (Lehane and Billingsley 1996).

Em relação às enzimas digestivas secretadas durante a digestão, foi demonstrado que os oocinetos imaturos de plasmódio são susceptíveis às proteases (Gass and Yeates 1979). Por outro lado, as proteases do intestino médio dos mosquitos também podem aumentar a infecção activando as proquitinases dos parasitas, o que conduz a uma invasão facilitada da matriz peritrófica (Shahabuddin 1998). Assim, os mecanismos de acção enzimática pós-alimentação afectam o parasita da malária num variado número de formas (Jahan *et al.* 1999).

3.5) Alimentação Artificial

De modo a elaborar protocolos experimentais que permitam a validação metodológica de ferramentas de controlo de malária, como por exemplo uma vacina anti-vectorial, é necessário um método que permita replicações exactas de infecções de mosquitos vectores. A produção de gametócitos em cultura (Weiss and Vanderberg 1977) veio colmatar a dificuldade inerente ao cálculo de taxas de parasitémia iguais em modelos murinos. Mais tarde as culturas de oocinetos (Janse *et al.* 1985) vieram permitir um estudo mais específico do ciclo de vida da malária, podendo os mosquitos alimentar-se e sofrer a invasão do epitélio intestinal mais rapidamente, o que conduziu à obtenção de outro tipo de resultados científicos. Embora o método de alimentação natural em animais reflecta a infecção real, o uso de alimentação por membranas permite estabelecer com uma maior minúcia as taxas de infecção dos mosquitos, permite infectar mosquitos de maneira semelhante a uma escala maior e é também mais ético em termos de experimentação científica (Sattabongkot *et al.* 2003).

4) Aminopeptidases

As aminopeptidases (EC 3.4.11.) são enzimas que catalizam a clivagem de aminoácidos a partir do terminal amina de uma proteína ou substrato proteico (Taylor 1993; Palmer 1995). São enzimas bastante conservadas e que se encontram em todos os representantes do reino Animal e Plantas, em organismos tão diversos com a *E. coli* e os mamíferos de grande porte, estando presentes em resíduos com importância em funções catalíticas e em resíduos envolvidos na ligação de iões metálicos (Taylor 1993). Têm funções celulares essenciais, como a quebra das ligações proteicas na digestão, e quase todas são inibidas pelo análogo – bestatina (Taylor 1993; Noriega *et al.* 2002). Podem ser monoméricas ou conjugar-se em compostos de massa elevada, sendo bilobadas, com o centro activo encontrando-se no lobo maior de cada protómero (Taylor 1993; Palmer 1995). Os iões de zinco são essenciais na ligação das aminopeptidases à maior parte dos substratos (Palmer 1995). Múltiplas aminopeptidases foram isoladas de insectos hematófagos e tem sido sugerido que podem desempenhar papéis diferentes na digestão (Briegel and Lea 1975).

4.1) Aminopeptidases no mosquito

O estudo das proteínas digestivas dos mosquitos tem sido uma abordagem utilizada para encontrar novas abordagens de estudo ao parasita da malária, uma vez que estes parasitas necessitam de passar pelo epitélio do intestino médio do mosquito durante o seu ciclo de vida (Bogitsh and Cheng 1998).

No caso de *An. gambiae*, as aminopeptidases são caracterizadas pela sua rápida indução após a refeição sanguínea, tendo um pico de actividade específica por volta das 24 horas após a ingestão da refeição (Chege *et al.* 1996; Lemos *et al.* 1996; Dana *et al.* 2005). A actividade relativa total destas enzimas noutros mosquitos, como o *An.*

stephensi, caracteriza-se por apresentar um decréscimo logo após a refeição, que tende a recuperar 36 horas após a alimentação (Billingsley 1990). As aminopeptidases nos mosquitos estão presentes primordialmente na parte posterior do intestino médio (Warr *et al.* 2007). Em mosquitos *Anopheles stephensi* verificou-se que estirpes com susceptibilidade reduzida ao *P. falciparum* têm níveis elevados de aminopeptidases (Feldmann *et al.* 1990).

Após a sequenciação do genoma de *An. gambiae* (Holt *et al.* 2002) estão descritos neste momento 15 genes com motivo para aminopeptidase na base de dados do site www.ensembl.org (Hubbard *et al.* 2006) (20 de Novembro de 2008), não estando ainda completamente estudados.

Estudos recentes de expressão génica em mosquitos *An. gambiae* tratados com cloroquina revelaram diferenças de expressão num gene de aminopeptidase (AGAP004860) em mosquitos infectados com *P. berghei* ANKA após alimentação sanguínea (Abrantes *et al.* 2008). Assim, a exploração de uma metodologia molecular no estudo de enzimas digestivas em mosquitos é uma nova abordagem que pode elucidar o potencial papel destas enzimas na infecção e na susceptibilidade de mosquitos para com os parasitas de malária (Xu *et al.* 2005; Dinglasan *et al.* 2007).

Objectivos

Em vista das interacções descritas entre as enzimas digestivas dos mosquitos, aminopeptidases, e a infecção por parasitas de malária, este trabalho teve como objectivos:

- 1- Caracterizar a expressão dos genes codificantes para as enzimas aminopeptidases de *Anopheles gambiae* s.s., após uma refeição sanguínea;
- 2- Caracterizar o efeito da infecção por *Plasmodium* na expressão de genes codificantes para aminopeptidases do mosquito *Anopheles gambiae*;
- 3- Verificar se existem diferenças na expressão dos genes de *Anopheles gambiae* codificantes para aminopeptidase, consoante a altura da penetração dos oocinetos no intestino médio do mosquito.

Material e Métodos

1) Manutenção das colónias de *Anopheles gambiae* e *Anopheles stephensi*

Os mosquitos da espécie *Anopheles gambiae* s.s. estirpe SUAKOKO, foram o modelo de vector utilizado para a avaliação da expressão das aminopeptidases do intestino médio. Os mosquitos da espécie *Anopheles stephensi* foram utilizados para manutenção do ciclo de vida do parasita *Plasmodium berghei*, estirpe ANKA, em laboratório. O protocolo de manutenção das colónias de mosquitos foi optimizado, de modo a maximizar o número de mosquitos utilizados por experiência. Foram testadas variações ao protocolo utilizado anteriormente na Unidade de Entomologia Médica, mais concretamente, no número de alimentações semanais da colónia de mosquitos *An. gambiae*, no intervalo de alimentação da colónia de *An. stephensi* e nas quantidades de anestésico a administrar aos ratos. Com estas alterações elaborou-se o protocolo que se encontra em anexo (Anexo I). Este foi utilizado ao longo de todo o procedimento experimental.

Ambas as espécies de mosquitos foram mantidas entre 26°C e 28°C, em condições de humidade relativa de 70 a 80% e num ciclo circadiano de 12 horas de luz, 12 horas de escuridão. Os mosquitos adultos foram alimentados ao longo da experiência por alimentação directa em ratos anestesiados (*Rattus rattus*) provenientes do biotério do IHMT, por injeção intramuscular de uma solução 1:1 de Ketamina (Imalgene®) e Cloridrato de Xilazina (Rompum®), 80mg/Kg de solução.

2) Manutenção do ciclo de vida do parasita de malária de roedor *Plasmodium berghei* em laboratório

O parasita da malária murina *P. berghei* ANKA, clone 2.34, proveniente da Unidade de Entomologia Médica e da Unidade de Malária, Centro de Malária e Doenças Tropicais (CMDT), do IHMT/UNL, foi mantido em laboratório em amostras criopreservadas de sangue de murgancho (*Mus musculus*, estirpe CD1, fêmeas). A manutenção do ciclo de vida do parasita fez-se por infecção de murganchos através da inoculação de sangue infectado e através da picada de mosquitos *An. stephensi* infectados.

Os murganchos foram inoculados intraperitonealmente com um volume de 0,1ml a 0,2ml de sangue de murgancho infectado com cerca de $1,8 \times 10^9$ eritrócitos parasitados (parasitêmias de cerca de 20%) e foram mantidos com uma solução de 0,05% de ácido 4-aminobenzóico (p/V) (PABA, Anexo II) (Keshavarz-Valian *et al.* 1985). A infecção foi seguida através da observação de esfregaços sanguíneos. Os esfregaços foram secos ao ar e fixados com metanol, seguidamente foram corados com solução de Giemsa a 10% (V/V) com água tamponada (pH 7,2) durante 30 minutos e lavados com água destilada (Anexo II). Quando a parasitemia atingiu valores entre os 10 e 20%, e a exflagelação era patente, os murganchos foram utilizados para infectar mosquitos que, por sua vez, iriam continuar o ciclo do parasita em laboratório. Para se efectuar o teste de exflagelação colocou-se uma gota de sangue parasitado numa lâmina, à qual se adicionou uma gota de meio de cultura RPMI (Anexo II), cobriu-se com uma lamela e, passados 10 minutos, a ocorrência ou não de exflagelação foi observada ao microscópio óptico 100x.

Os mosquitos infectados foram mantidos com uma solução de frutose a 10%, com 0,05% (p/V) de PABA, a uma temperatura entre os 18°C e os 20°C, durante 20 dias. Os murganhos infectados foram sempre fêmeas da estirpe CD1, às quais era injectada intraperitonealmente, 3 dias antes da infecção, 200µl de Phenilhidrazina (6mg/ml) (Anexo II). Este composto incentiva a formação de reticulócitos jovens, cujos os parasitas preferem infectar, e assim melhora a taxa de infecção (Landau and Boulard 1978; Evans *et al.* 2006).

3) Infecção de mosquitos com *Plasmodium berghei*, por alimentação artificial de cultura de oocinetos ou por alimentação natural em murganhos infectados

Os murganhos utilizados neste trabalho em ambos os protocolos foram infectados através dos métodos descritos no ponto 2. Quando a parasitémia atingiu valores entre os 10% e os 20% e revelava exflagelação patente os murganhos foram utilizados para alimentação directa de mosquitos *An. gambiae*.

Com o objectivo de recolher as amostras de intestinos médios infectados para trabalhar posteriormente por métodos moleculares, foram executados dois protocolos experimentais diferentes. Estes protocolos foram utilizados de forma a obter resultados relativos à penetração dos oocinetos em tempos diferentes. Antes das 24 horas após refeição sanguínea, que é o pico teorizado para a actividade de aminopeptidases, foram feitas alimentações artificiais com cultura de oocinetos. Mais próximo desse pico de actividade, foram feitas alimentações naturais.

3.1) Alimentação Artificial (AA) de mosquitos por membrana

Este protocolo consistiu em três fases: *i)* Cultura de oocinetos de *P. berghei*; *ii)* Infecção de mosquitos *An. gambiae*; *iii)* Dissecção dos mosquitos alimentados e conservação das amostras.

i) Procedeu-se primeiramente à cultura de oocinetos de *P. berghei*. Sumariamente, aos murganhos infectados foi retirado o sangue por punção cardíaca que, de seguida, foi filtrado através de uma coluna de fibrocelulose CF11, para um frasco de cultura, de modo a retirar os linfócitos. Ao eluído foi adicionado meio RPMI completo (Anexo II) até perfazer a diluição 1:10. A cultura foi mantida à temperatura controlada de 18°C durante 24 horas. Às 20 horas após início da cultura foi efectuado um controlo para verificar a presença de oocinetos, retirando uma amostra e efectuando um esfregaço que foi corado com Giemsa, como descrito anteriormente. Após se verificar o estado da cultura, por observação microscópica de oocinetos, esta encontrava-se em condições para a infecção dos mosquitos.

ii) Mosquitos fêmeas de *An. gambiae* entre os 2 e os 10 dias, não alimentados com refeição sanguínea anteriormente, foram infectados por alimentação artificial através de membranas de Parafilm®M (Pechiney Plastics) com a cultura de oocinetos elaborada no ponto *i*. Para tal, a cultura foi centrifugada a 1000g, durante 10 minutos, a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e diluiu-se o material depositado com sangue fresco de murganho não infectado 1:1. Colocou-se a mistura numa câmara de alimentação artificial mantida a 37°C, por sistema de “banho-maria” e permitiu-se a alimentação dos mosquitos. Após uma hora de exposição dos mosquitos ao alimentador retiraram-se da gaiola as fêmeas que não efectuaram refeição sanguínea.

iii) As fêmeas alimentadas foram dissecadas em PBS (Anexo II) às 3 e 6 horas após a alimentação. Os intestinos médios foram removidos e armazenados em solução de RNeasy® (Ambion Inc) e conservados a -20°C para posterior utilização, a fim de detectar a expressão de genes de aminopeptidases. Efectuaram-se também os respectivos controlos negativos, que consistiram na dissecação de intestinos médios de mosquitos alimentados pelo mesmo método mas sem cultura de oocinetos, apenas com uma pseudocultura de sangue de murgancho não infectado, para os mesmos pontos temporais da experiência que os mosquitos infectados.

Este protocolo foi executado por quatro vezes no decorrer do trabalho.

3.2) Alimentação natural (AN) em murganchos infectados

O segundo protocolo utilizado consistiu também em três fases: i) Infecção de murganchos com *P. berghei*; ii) Infecção de mosquitos *An. gambiae*; iii) Dissecação dos mosquitos alimentados e conservação das amostras.

i) A infecção de murganchos foi feita como descrito anteriormente no ponto 2.

ii) Ao atingir as condições de parasitemia descritas anteriormente no ponto 3, o murgancho foi anestesiado e exposto aos mosquitos para que estes se alimentassem no roedor, durante uma hora. Após este tempo retiraram-se da gaiola as fêmeas que não efectuaram refeição sanguínea.

iii) As fêmeas alimentadas foram dissecadas às 12horas, 18horas e 24horas após a refeição sanguínea, pelo método descrito anteriormente em 3.1.iii. Efectuaram-se também os respectivos controlos negativos, que consistiram na dissecação de intestinos médios de mosquitos alimentados pelo mesmo método num murgancho não infectado para os mesmos pontos temporais da experiência que os mosquitos infectados.

Este protocolo foi executado por três vezes durante o decorrer do trabalho.

As amostras obtidas foram classificadas da seguinte forma:

-Alimentação Artificial (AA) – 1, 2, 3, 4 – referentes a cada feita em **3.1**

-Alimentação Natural (AN) – I, II, III – referentes a cada experiência feita em **3.2**

4) Extracção de RNA

Foram utilizados três protocolos diferentes para a realização da extracção de RNA das amostras de intestinos médios de *An. gambiae*. Após as extracções, as concentrações de RNA foram medidas utilizando o aparelho GenQuant (Pharmacia,USA).

4.1) 1º protocolo de extracção

O kit de extracção de RNA BIORAD, Aquapure™ RNA isolation kit foi utilizado na extracção de RNA das amostras relativas à experiência AA1. Após remoção do RNAlater® procedeu-se à extracção, segundo as instruções do fabricante. Sumariamente este protocolo consiste na homogeneização mecânica das amostras, às quais se adiciona solução de lise e rapidamente se precipita e hidrata o RNA, por lavagem com isopropanol e etanol e utilizando uma solução de hidratação de RNA.

4.2) 2º protocolo de extracção

O kit de extracção da Quiagen, RNeasy mini ® foi utilizado na extracção de RNA das amostras relativas à experiência AA3 e ANI. Após remoção do RNAlater® procedeu-se à extracção, segundo as instruções do fabricante. Sumariamente este protocolo consiste na utilização de uma série de colunas de filtração e soluções de precipitação e hidratação de RNA

4.3) 3º protocolo de extracção

O kit de extracção de RNA da Macherey-Nagel, NucleoSpin RNA II ® foi utilizado na extracção de RNA das amostras relativas à experiência ANII, ANIII e AA4. Após remoção do RNAlater® procedeu-se à extracção, segundo as instruções do fabricante. Este protocolo tem condições semelhantes ao anterior tendo ainda um passo adicional de tratamento com DNase.

Após a extracção de RNA todas as amostras foram guardadas a -80°C para a sua posterior conversão em DNA complementar (cDNA).

5) Quantificação de expressão de aminopeptidases por Polimerase Chain Reaction em tempo real quantitativa (qRT-PCR)

5.1) Síntese de DNA complementar

Procedeu-se à síntese de DNA complementar (cDNA) de cadeia simples das amostras correspondentes às alimentações naturais AN I, AN II e AN III. Procedeu-se a um tratamento com DNase para a AN I, que foi extraída com um protocolo que não continha este passo. Num tubo adicionou-se 2µg de RNA, a 6µl de Tampão RT (5x), 1,5µl de 0,5mM dNTPs e oligo(dt) (200µg/ml). Esta mistura de reacção foi incubada durante 5 minutos a 65° C e durante 10 minutos a 37° C, adicionando-se de seguida 1µl da enzima transcriptase reversa MMLV-RT (Invitrogen- Life Technologies). Misturou-se a nova solução a mesma foi incubada durante 50 minutos a 37° C. Aqueceu-se novamente a amostra a 75° C durante 5 minutos para desactivação da enzima e guardaram-se as amostras a -20°C, para o estudo posterior.

5.2) Desenho dos primers

Foram identificados 4 genes com motivo para aminopeptidase no genoma de *An. gambiae* na base de dados Ensemble, (www.ensembl.org a 18 de Dezembro de 2007) (Hubbard *et al.* 2006) que estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Localização dos genes estudados no genoma de *Anopheles gambiae*, correspondentes à família ENSF00000001133, Aminopeptidase:

| Gene ID | Genome Location |
|------------|-----------------------|
| AGAP005728 | Chromosome 2L: 19.77m |
| AGAP003077 | Chromosome 2R: 32.23m |
| AGAP003695 | Chromosome 2R: 42.05m |
| AGAP000885 | Chromosome X: 16.73m |

Para cada um dos genes foram desenhados um par de sequências iniciadoras ou *primers*, excepto para o gene AGAP003695, para o qual foram desenhados dois pares de *primers* devido ao seu tamanho bastante longo e à presença prevista de vários intrões. Os *primers* foram desenhados no programa de acesso livre online Primer3® (<http://frodo.wi.mit.edu>, Dezembro 2007) e sintetizados pela empresa STABvida, Portugal, estando representados na Tabela 2.

Tabela 2: Representação dos *primers* forward e reverse para os genes da família aminopeptidase de *Anopheles gambiae*:

| Gene | <i>primer</i> |
|--------------|--|
| AGAP005728 | FW – 5' ttc aag ttc gat cgg aca cc 3' |
| | REV – 5' cgg tcc tcg acg taa tcg ta 3' |
| AGAP003077 | FW – 5' gtg gaa aac ccg aac caa at 3' |
| | REV – 5' tac gcc agc ttc tcc agg ta 3' |
| AGAP003695-1 | FW – 5' acc aca gcc tta gca aag ca 3' |
| | REV – 5' gtt ggc gaa tcc ttc att ca 3' |
| AGAP003695-2 | FW – 5' tat caa agc gct agc cag ga 3' |
| | REV – 5' tcc aga tcg atg gtt tcg tc 3' |
| AGAP000885 | FW – 5' tct gcg cgt cta cac aca tc 3' |
| | REV – 5' cgg gaa gcg tta ggt ttt tc 3' |

5.3) Preparação da curva padrão de DNA de *Anopheles gambiae*

A quantificação relativa dos níveis de expressão foi determinada usando uma curva-padrão preparada a partir de diluições seriadas de DNA genómico. O DNA foi extraído em duas amostras, cada uma contendo intestinos médios de 30 mosquitos de *An. gambiae* fêmeas não alimentadas, utilizando o kit de extracção de DNA da Quiagen, DNeasy®. A extracção foi feita segundo as instruções do fabricante, com a excepção do tempo de digestão com proteinase K, em que as amostras foram mantidas de um dia para o outro a 55° C, de forma a optimizar a digestão dos tecidos. A concentração de DNA foi determinada através da absorvância a 260 nm, utilizando o espectofotómetro GeneQuant® (Pharmacia, USA) e a pureza foi determinada através do rácio 260nm/280nm. Foram efectuadas diluições seriadas do DNA extraído, de 100, 10, 1 e 0,1 e 0,01 ng/ml.

5.4) Quantitive Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR):

Para o estudo da variação de expressão dos genes codificantes para aminopeptidase de *An. gambiae* utilizou-se a técnica de PCR em tempo real num termociclador *iCycler iQTM* (Bio-Rad, USA). Para cada mistura de reacção de PCR em tempo real utilizou-se 10µl solução IQ SYBRGreen supermix ® (Bio-Rad), 0,3µM de primers forward e reverse correspondentes a cada gene em estudo, 1µl de DNA e água MilliQ perfazendo 20 µl de solução final. Cada uma das amostras foi feita em triplicado. As condições de amplificação consistiram num passo inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 95°C e um minuto a 62°C. A especificidade da reacção foi analisada através duma curva de dissociação do produto amplificado. A curva de dissociação foi gerada ao final da reacção de amplificação,

através de pequenos aumentos de temperatura e constante monitorização da fluorescência.

6) Análise de resultados

O programa utilizado para a obtenção dos resultados permitiu quantificar as amostras estudadas pela determinação da fluorescência das amostras em comparação com os valores da curva padrão, em relação a cada gene. Os dados obtidos foram normalizados por comparação com um gene de referência, que codifica para a proteína ribossomal S7, para o qual também foi feita uma reacção de qRT-PCR nas mesmas condições das amostras e com a utilização do mesmo DNA da curva padrão. O gene S7 foi escolhido como controlo interno pois a sua expressão é constante e não é afectada pelo protocolo experimental.

Após análise no programa informático do próprio termociclador iCycler™ (Biorad), foram descartados os valores dos triplicados que eram claramente diferentes e os pontos que se encontravam fora da curva padrão, como exemplificado pela figura 3 (Anexo III).

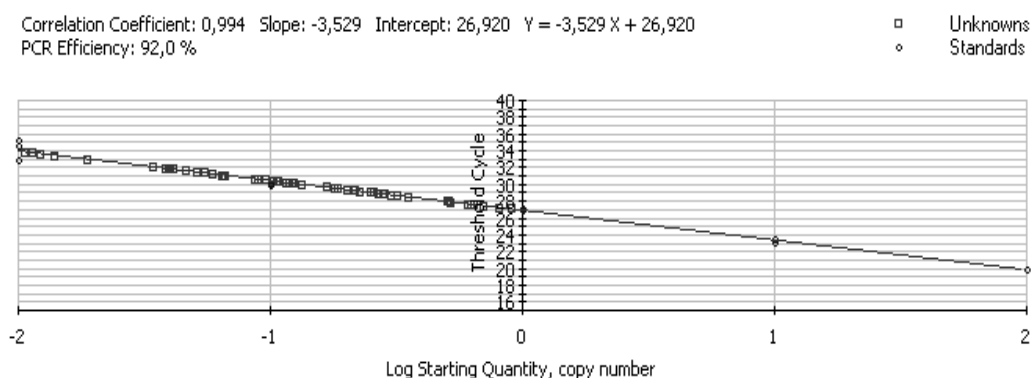


Figura 3- Exemplo do gráfico de uma curva padrão obtida por qRT-PCR. Os pontos das amostras estão representados por quadrados e os pontos das diluições da curva padrão estão representados por círculos. O gráfico representa o logaritmo do factor de diluição em função do C_T (threshold cycle). Neste caso a recta tem um coeficiente de correlação de 0,994 e uma eficiência de 92,0%

Os resultados da expressão correspondentes ao ciclo em que as curvas das amostras atingem o valor da linha de limiar, *threshold*, (Ct) obtidos após a análise e tratamento dos resultados estão exemplificados no Anexo III. A média dos valores obtidos dos triplicados foi normalizada, fazendo a sua divisão pelo valor correspondente do gene ribossomal S7. Foram determinadas as variações de expressão dos genes ao longo do tempo em mosquitos infectados e não infectados, utilizando como valor a mediana das três experiências.

Foram comparados estatisticamente, utilizando o teste não-paramétrico Mann-Whitney U, os valores de expressão dos genes de aminopeptidase de mosquitos infectados e o controlo não infectado, entre os mosquitos alimentados e as 0 horas (antes da alimentação) para infectados e controlo e entre os tempos experimentais entre si. Os valores de significância foram calculados considerando-se haver diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para um $P < 0,05$. O programa Statistica 5.1© (StatSoft Inc, USA) foi utilizado para a análise dos dados.

Resultados

1) Infecção de mosquitos por alimentação artificial de oocinetos de *Plasmodium berghei* e por alimentação em murganhos infectados

1.1) Alimentação Artificial (AA) em membrana

Em cada uma das quatro experiências de alimentação artificial (AA1, AA2, AA3, AA4) foram utilizados três murganhos infectados para a infecção de mosquitos e três murganhos não infectados para as experiências de controlo. Os infectados apresentaram taxas de parasitémia que variaram entre os 15% e os 30% e teste de exflagelação positivo. Verificou-se, vinte horas após o início das culturas, que estas apresentavam oocinetos e foram seguidamente utilizadas para infectar os mosquitos.

Com o objectivo de confirmar a infecção experimental, foram mantidas fêmeas de mosquito alimentadas durante 15 dias para se observar a presença de oocisto nos intestinos médios. Na AA3 foram dissecadas 11 fêmeas e observaram-se oocistos em 9 delas. Na AA2 e AA1, devido ao facto de se ter alimentado um número insuficiente de fêmeas, apenas foram colectados os intestinos médios dos mosquitos às 6 e 12 horas após a refeição, não se tendo colectado ao dia 15 pós-infecção. O número de intestinos médios colectados para a extracção de RNA em cada experiência de AA encontra-se representado na Tabela 3.

Tabela 3 - Número de intestinos médios dissecados em cada experiência (AA1, AA2, AA3, AA4) de alimentação artificial:

| | Número de intestinos médios dissecados | | | | | | | |
|---------|--|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
| | AA1 | | AA2 | | AA3 | | AA4 | |
| | infectado | controlo | infectado | controlo | infectado | controlo | infectado | controlo |
| 0 horas | 13 | | 9 | | 33 | | 28 | |
| 3 horas | 33 | 2 | 7 | 9 | 29 | 32 | 22 | 14 |
| 6 horas | 3 | 38 | - | - | 30 | 15 | 23 | 1 |

1.2) Alimentação Natural em murganhos (AN)

Em cada uma das três experiências de alimentação natural de mosquitos (AN I, AN II, AN III) foi utilizado um murganho infectado, com uma taxa de parasitemia entre os 15% e os 25% e com exflagelação patente, para a infecção de mosquitos e um murganho não infectado para as experiências de controlo. Quando possível mantiveram-se fêmeas alimentadas infectadas durante 12 dias após a experiência para verificar a presença de oocistos. Na AN III foram dissecadas 10 fêmeas e observaram-se oocistos em 3 delas. O número de intestinos médios dissecados em cada uma das experiências de AN encontra-se representado na Tabela 4.

Tabela 4 - Número de intestinos médios dissecados em cada experiência (AN I, AN II, AN III) de alimentação natural:

| | Número de intestinos médios dissecados | | | | | |
|----------|--|----------|-----------|----------|-----------|----------|
| | AN I | | AN II | | AN III | |
| | infectado | controlo | infectado | controlo | infectado | controlo |
| 0 horas | 30 | | 30 | | 32 | |
| 12 horas | 25 | 17 | 26 | 27 | 32 | 20 |
| 18 horas | 29 | 17 | 28 | 27 | 34 | 22 |
| 24 horas | 11 | 11 | 23 | 13 | 30 | 14 |

2) Extracção de RNA

2.1) 1º protocolo de extracção

Utilizou-se este kit de extracção unicamente para a experiência AA1 (Tabela 5). Durante o processo de extracção houve uma perda de material, durante a fase de homogeneização dos intestinos médios utilizando um pistão de plástico, que resultou numa concentração de RNA insuficiente para a continuação da utilização desta experiência no resto do trabalho. Seriam necessários 2µg de RNA em 20µl de solução para proceder à continuação da síntese em cDNA, o que não se obteve (Tabela 5).

Tabela 5- Absorvância, rácio e concentração de RNA das amostras correspondentes às zero, três e seis horas após a refeição sanguínea da alimentação artificial 1 (AA1):

| | Absorvância a 260nm | | Rácio 260/280nm | | [RNA] µg/ml | |
|---------|---------------------|----------|-----------------|----------|-------------|----------|
| | infectado | controle | infectado | controle | infectado | controle |
| 0 horas | | 0,028 | | 0,787 | | 55 |
| 3 horas | - | - | - | - | - | 55,3 |
| 6 horas | - | - | - | - | 60,2 | 56,2 |

2.2) 2º protocolo de extracção

Este kit foi utilizado na extracção de RNA das amostras relativas às experiências AA3 (Tabela 6) e AN I (Tabela 7). Mais uma vez as amostras relativas à alimentação artificial revelaram uma concentração de RNA final insuficiente para a continuação do estudo, no entanto, utilizando o mesmo método de extracção para a alimentação natural as amostras obtidas revelaram-se suficientes para a síntese de cDNA.

Tabela 6- Absorvância, rácio e concentração de RNA das amostras correspondentes às zero, três e seis horas após a refeição sanguínea da alimentação artificial 3 (AA3):

| | Absorvância a 260nm | | Rácio 260/280nm | | [RNA] µg/ml | |
|---------|---------------------|----------|-----------------|----------|-------------|----------|
| | infectado | controle | infectado | controle | infectado | controle |
| 0 horas | | 0,020 | | 1,266 | | 40 |
| 3 horas | 0,048 | 0,017 | 1,110 | 2,184 | 95 | 34,5 |
| 6 horas | 0,006 | 0,035 | 1,310 | 1,319 | 11,8 | 70,2 |

Tabela 7- Absorvância, Rácio e Concentração de RNA das amostras correspondentes às zero, doze, dezoito e vinte e quatro horas após a refeição sanguínea da alimentação natural I (ANI):

| | Absorvância a 260nm | | Rácio 260/280nm | | [RNA] µg/ml | |
|----------|---------------------|----------|-----------------|----------|-------------|----------|
| | infectado | controle | infectado | controle | infectado | controle |
| 0 horas | | 0,006 | | 1,42 | | 172 |
| 12 horas | 0,069 | 0,069 | 1,48 | 1,468 | 124 | 138,9 |
| 18 horas | 0,089 | 0,065 | 1,456 | 1,454 | 177,6 | 129,6 |
| 24 horas | 0,034 | 0,031 | 1,548 | 1,407 | 67,7 | 62,9 |

2.3) 3º protocolo de extracção

Após um teste de extracção de RNA com intestinos médios de *An. stephensi* alimentados com refeição sanguínea, em que se verificou os bons resultados do kit (dados não apresentados), este foi utilizado na extracção de RNA das amostras relativas à experiência AN II, AN III (Tabela 8) e AA4 (Tabela 9). As alimentações naturais obtiveram boas concentrações de RNA, o que também aconteceu, desta vez, com a alimentação artificial 4, no entanto, a AA 4 foi descartada da continuação do trabalho e conservada a -80°C devido à falta de dados das outras alimentações artificiais para comparação e também devido ao facto de o número de intestinos médios do último controlo ter sido insuficiente para extrair RNA.

Tabela 8- Absorvância, Rácio e Concentração de RNA das amostras correspondentes às zero, doze, dezoito e vinte e quatro horas após a refeição sanguínea das alimentações naturais II e III (AN II, AN III):

| | AN II | | | | | | AN III | | | | | |
|----------|---------------------|-------|-----------------|-------|-------------|------|---------------------|-------|-----------------|-------|-------------|-------|
| | Absorvância a 260nm | | Rácio 260/280nm | | [RNA] µg/ml | | Absorvância a 260nm | | Rácio 260/280nm | | [RNA] µg/ml | |
| | inf | ctrl | inf | ctrl | inf | ctrl | inf | ctrl | inf | ctrl | inf | ctrl |
| 0 horas | 0,034 | | 1,46 | | 68,9 | | 0,069 | | 1,490 | | 138,7 | |
| 12 horas | 0,069 | 0,034 | 1,46 | 1,39 | 137,9 | 68,3 | 0,187 | 0,080 | 1,459 | 1,451 | 373,3 | 160,3 |
| 18 horas | 0,079 | 0,034 | 1,29 | 1,104 | 158 | 68,8 | 0,286 | 0,052 | 1,482 | 1,439 | 411,7 | 103,5 |
| 24 horas | 0,080 | 0,033 | 1,343 | 1,141 | 160,1 | 66,2 | 0,147 | 0,067 | 1,498 | 1,439 | 293,8 | 133,7 |

Tabela 9- Absorvância, rácio e concentração de RNA das amostras correspondentes às zero, três e seis horas após a refeição sanguínea da alimentação artificial 4 (AA 4):

| | Absorvância a 260nm | | Rácio 260/280nm | | [RNA] µg/ml | |
|---------|---------------------|----------|-----------------|----------|-------------|----------|
| | infectado | controlo | infectado | controlo | infectado | controlo |
| 0 horas | 0,053 | | 1,145 | | 105,9 | |
| 3 horas | 0,095 | 0,405 | 1,146 | 1,417 | 190 | 210,4 |
| 6 horas | 0,074 | - | 1,471 | - | 154,2 | - |

3) Análise de resultados

Nesta análise dos dados relativos aos PCR's quantitativos em tempo real tornou-se necessário proceder a uma avaliação crítica dos valores de expressão obtidos. Assim, para a normalização final dos resultados, foram eliminadas as amostras ANII, 12 horas, infectado e ANIII, 18 horas, controlo, dos resultados da curva padrão do gene de referência S7, por se encontrem claramente fora dos restantes valores obtidos.

3.1) Variação de expressão

Para os 4 genes estudados neste trabalho estão apresentados de seguida os gráficos correspondentes às variações da expressão de cada gene ao longo do tempo, após a refeição sanguínea infectante e de controlo (não infectante). Seguida da comparação entre as variações de expressão dos dois tipos de refeições em relação ao tempo 0 horas (mosquitos não alimentados), e também da razão entre mosquitos infectados e não infectados. A expressão está representada em unidades arbitrárias, correspondentes à mediana das três experiências da média do valor de Ct (Ct_{mean}) obtida pelo programa IqcylerTM (Anexo III).

Gene AGAP005728

A expressão deste gene não apresenta grandes variações ao longo do tempo ($P > 0,05$). Contudo, observou-se uma pequena diminuição após a alimentação, seguida de um aumento constante até às 24h (Figura 4). Não houve diferenças significativas entre os valores de expressão para cada tempo experimental em relação uns aos outros. A expressão do gene nos mosquitos alimentados em relação ao tempo 0 (não alimentados) é semelhante ao longo do tempo para cada tempo experimental ($P > 0,05$) (Figura 5).

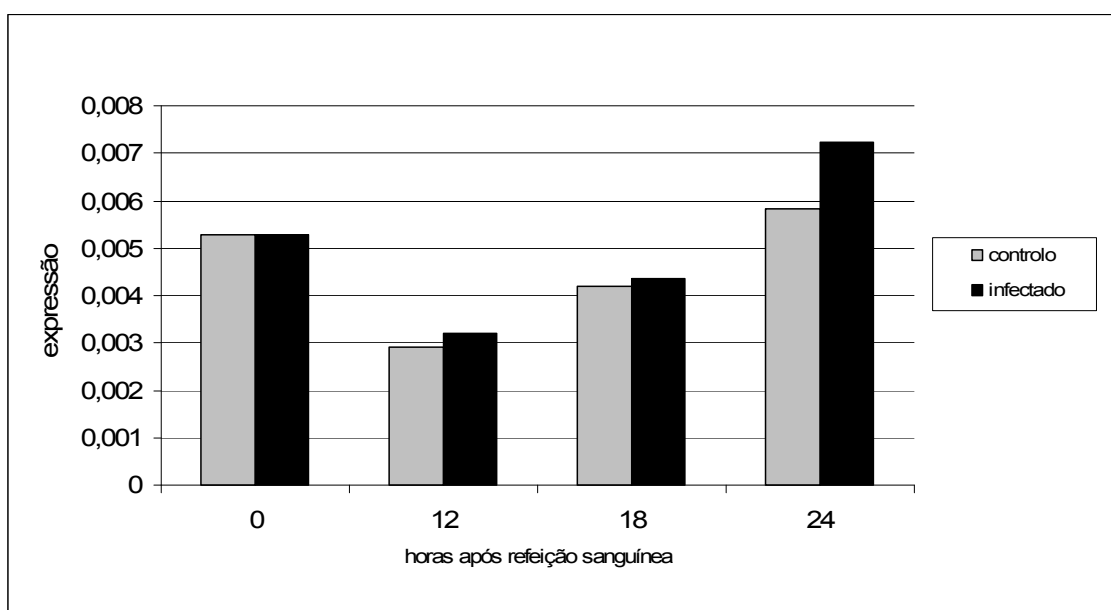


Figura 4- Variação ao longo do tempo da expressão do gene AGAP005728 de *An. gambiae* após refeição sanguínea. Controle, não infectante (cinzento) e infectante (preto)

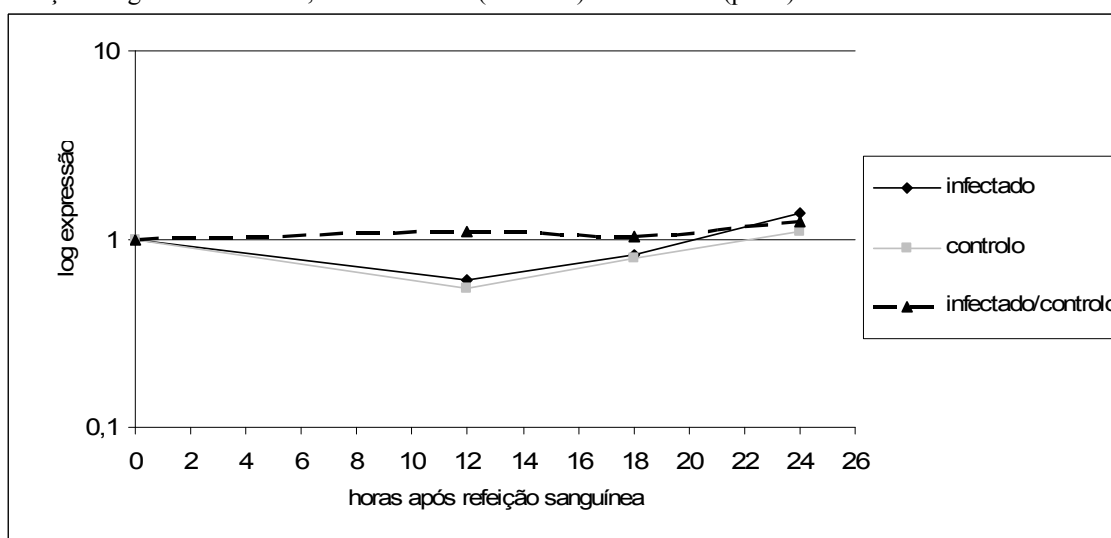


Figura 5- Variação da expressão do gene AGAP005728 em relação à expressão no tempo 0 (não alimentados). Preto, infectado; Cinzento, controle; Tracejado, razão entre infectado e controle

Gene AGAP003077

A expressão deste gene diminui logo após a refeição sanguínea, tendo um pico às 18 horas, o que torna o valor da expressão positivo para esse tempo experimental, por comparação com as 0 horas, tanto nos mosquitos infectados como no controle (Figura 7). A expressão diminui novamente às 24 horas (Figura 6). Não houve diferenças significativas entre os valores de expressão para cada tempo experimental. Este comportamento é semelhante entre mosquitos infectados e não infectados ($P = 0,84$) (Figura 7).

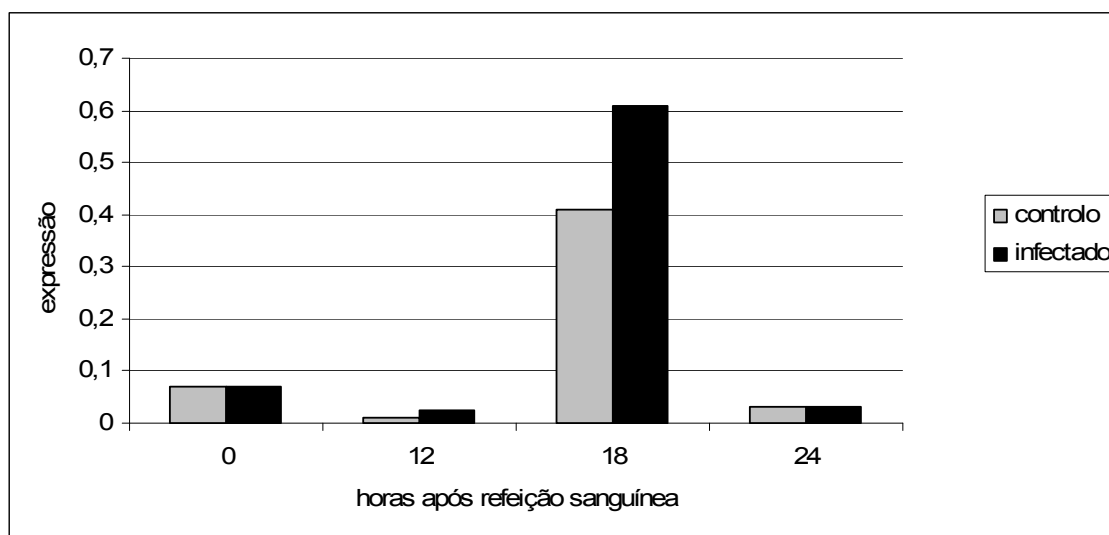


Figura 6- Variação ao longo do tempo da expressão do gene AGAP003077 de *An. gambiae* após refeição sanguínea. Controle, não infectante (cinzento) e infectante (preto)

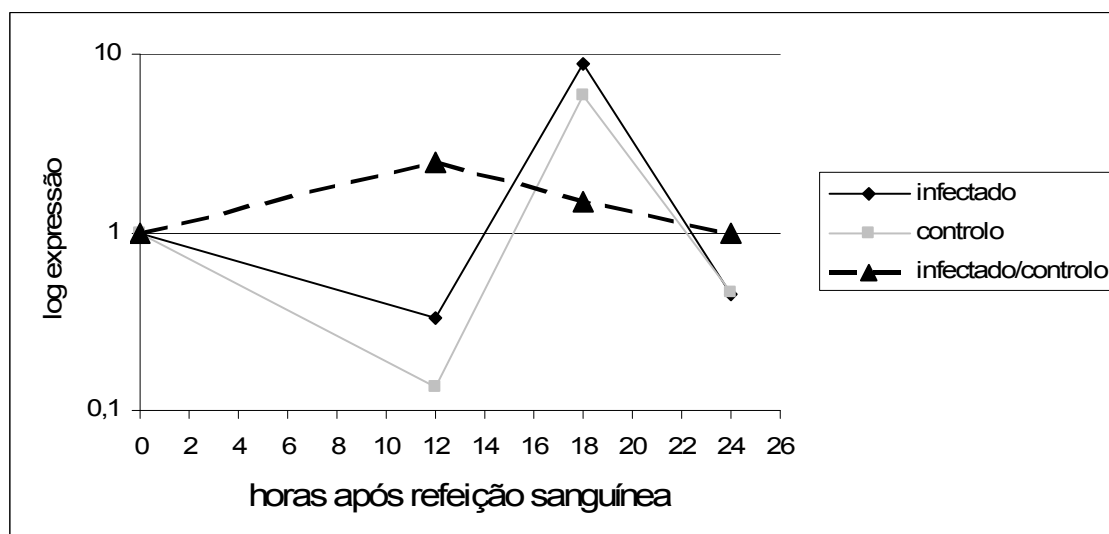


Figura 7- Variação da expressão do gene AGAP003077 em relação à expressão no tempo 0 (não alimentados). Preto, infectado; Cinzento, controle; Tracejado, razão entre infectado e controle

Gene AGAP003695

A primeira análise a este gene revela que a sua expressão é pouco alterada imediatamente após a refeição sanguínea ($P > 0,05$), podendo no entanto observar-se um relativo aumento da expressão, atingindo um máximo às 24 horas (Figura 8). Não houve diferenças significativas entre os valores de expressão para cada tempo experimental. O comportamento entre infectados e não infectados é semelhante, salientando-se às 18 horas um aumento de expressão, não significativo em relação ao controlo ($P = 0,25$) nem em relação às 0 horas ($P = 0,28$), nos infectados (Figura 8, 9).

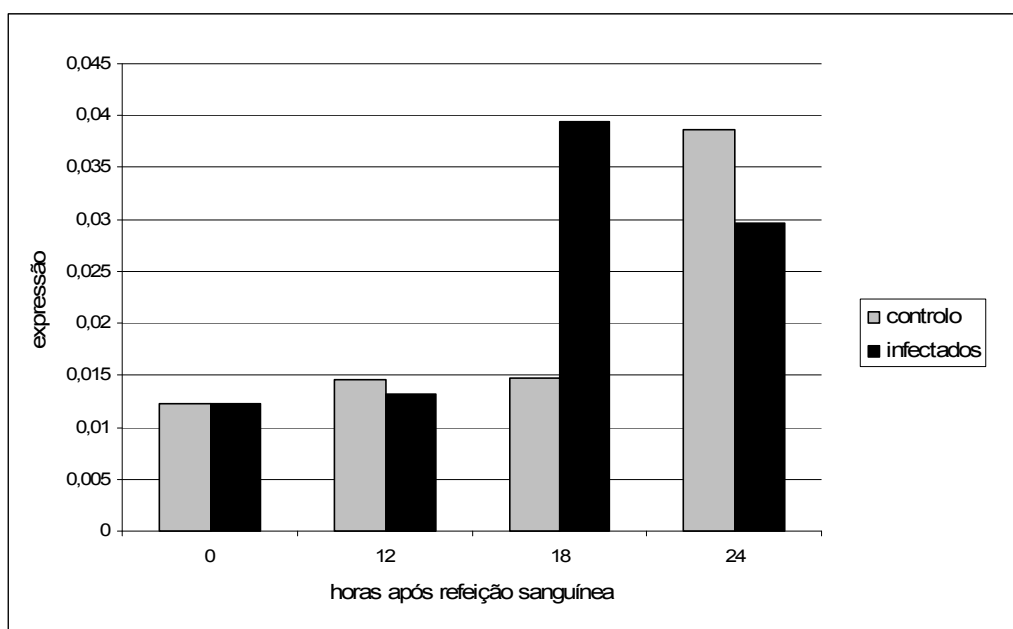


Figura 8- Variação ao longo do tempo da expressão do gene AGAP003695 de *An. gambiae* após refeição sanguínea. Controlo, não infectante (cinzento) e infectante (preto)

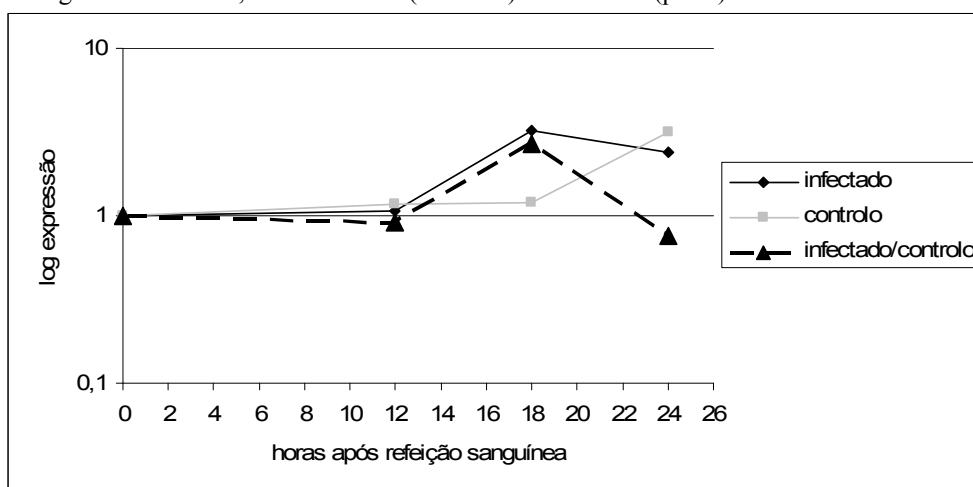


Figura 9- Variação da expressão do gene AGAP003695 em relação à expressão no tempo 0 (não alimentados). Preto, infectado; Cinzento, controlo; Tracejado, razão entre infectado e controlo.

Gene AGAP003695 (segundo par de primers):

A segunda análise do gene apresenta valores de expressão mais elevados antes da alimentação, estando regulada negativamente após a refeição sanguínea (Figuras 10, 11). Não houve diferenças significativas entre os restantes valores de expressão para cada tempo experimental. A variação de expressão entre infectados e não infectados é semelhante ($P = 0,85$) (Figura 11).

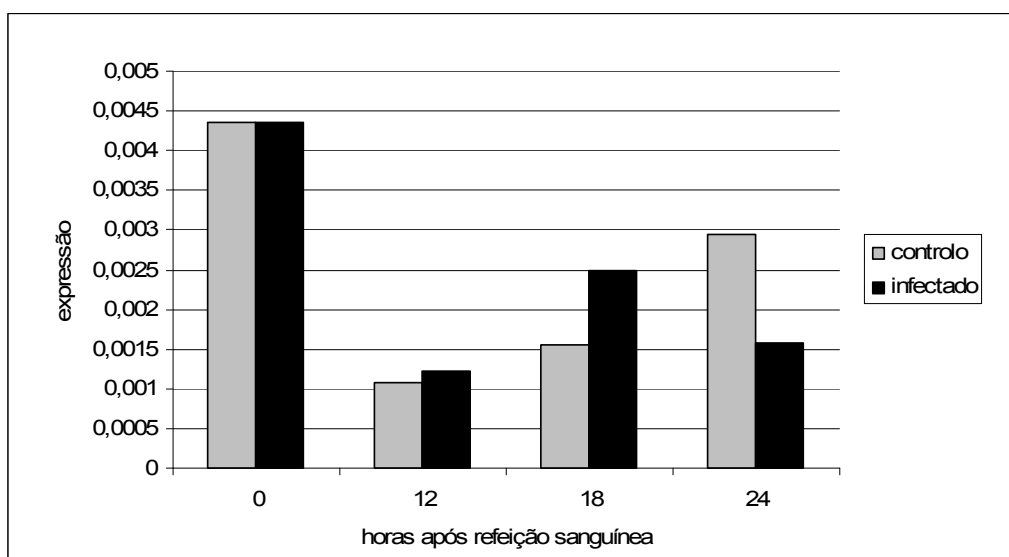


Figura 10- Variação ao longo do tempo da expressão do gene AGAP003695 de *An. gambiae* após refeição sanguínea. Controle, não infectante (cinzento) e infectante (preto)

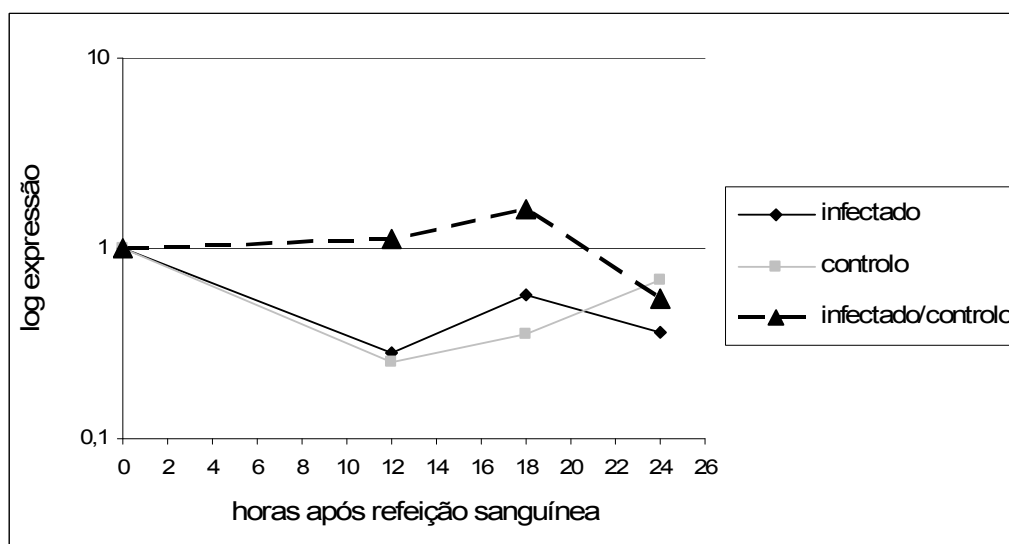


Figura 11- Variação da expressão do gene AGAP003695 em relação à expressão no tempo 0 (não alimentados). Preto, infectado; Cinzento, controle; Tracejado, razão entre infectado e controle

Gene AGAP000885

Neste gene pode verificar-se que no controlo há uma expressão do gene mais elevada às 24 horas (Figura 12) embora este valor não seja significativo em relação aos mosquitos infectados ($P = 0,12$). A variação da expressão é relativamente diferente entre infectados e o controlo, apresentando nos primeiros uma diminuição de expressão após a alimentação, que se mantém ao longo do tempo, enquanto que no controlo esta regulação negativa não se mantém, passando a positiva às 24 horas. Embora apresente esta diferença, efectuando o teste estatístico a diferença revelou-se como não significativa ($P = 0,22$) (Figura 13). Não houve diferenças significativas entre os valores de expressão para cada tempo experimental.

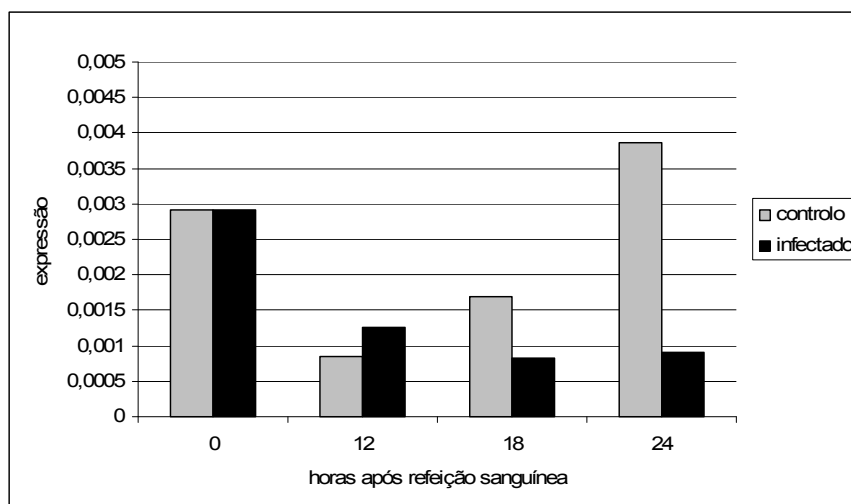


Figura 12- Variação ao longo do tempo da expressão do gene AGAP000885 de *An. gambiae* após refeição sanguínea. Controlo, não infectante (cinzento) e infectante (preto)

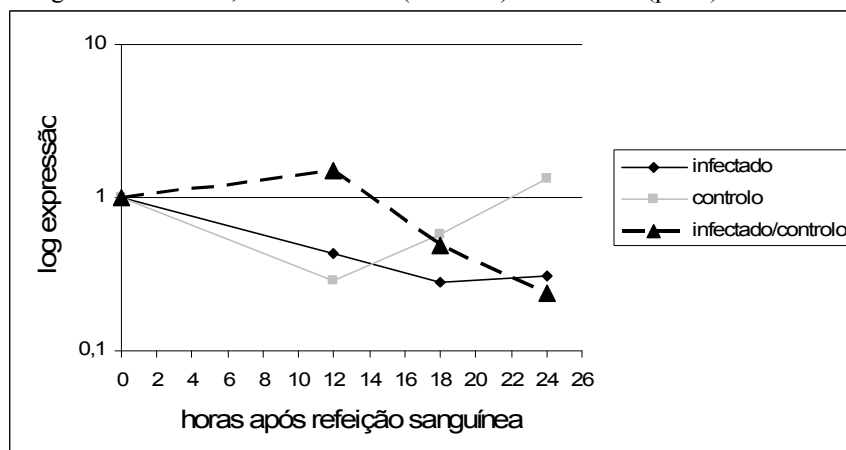


Figura 13- Variação da expressão do gene AGAP000885 em relação à expressão no tempo 0 (não alimentados). Preto, infectado; Cinzento, controlo; Tracejado, razão entre infectado e controlo

Resumindo a análise estatística. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) entre os valores de expressão dos genes de aminopeptidase de mosquitos infectados e o controlo não infectado, entre os mosquitos alimentados e as 0 horas (antes da alimentação), tanto para infectados como para o controlo e entre os tempos experimentais entre si.

Discussão e Conclusões

Após observação dos resultados podemos verificar que, dos 4 genes de aminopeptidase do intestino médio de *An. gambiae* estudados, nenhum apresentou diferenças significativas de expressão em relação às 0 horas (mosquitos não alimentados). Também não houve diferença significativa na comparação entre expressões dos genes de mosquitos alimentados com refeição infectante e não infectante. Sendo os genes analisados neste trabalho todos correspondentes a enzimas digestivas, esperar-se-ia previamente que estes genes fossem alterados devido à refeição sanguínea, positiva ou negativamente.

Analisando as variações gene a gene podemos verificar, no entanto, alguns resultados interessantes. O gene AGAP000885 denota já alguma variação nos valores de expressão às 24 horas após alimentação, em relação aos mosquitos não alimentados e, de todo o conjunto de genes estudados, é o que varia mais na relação alimentação infectante/não infectante ($P = 0,22$).

No gene AGAP003077, a expressão às 12 horas após a refeição sanguínea diminui em relação aos mosquitos não alimentados e sofre um aumento às 18 horas, variação esta que é bastante semelhante aos resultados apresentados no estudo de Chege e colaboradores (1996) relativos à actividade enzimática de aminopeptidases. Nesse estudo observou-se, no entanto, uma grande diferença em termos de actividade enzimática antes e após a refeição sanguínea, que contraria os restantes resultados do nosso trabalho relativos a este gene específico. A expressão de aminopeptidase às 24 horas, que tem um máximo de actividade enzimática no estudo citado, no gene AGAP003077 apresenta uma expressão negativa, em relação aos mosquitos não alimentados.

Analisando o gene AGAP003695 com o primeiro par de primers, é possível observar uma discrepância nos valores de expressão às 18 horas para os mosquitos que fizeram refeição infectante. Embora sem valor significativo ($P = 0,25$), esta variação pode ser hipoteticamente consequência do início da penetração dos oocinetos no epitélio intestinal do mosquito. Seria interessante confirmar esta teoria em estudos futuros.

A diferença obtida na expressão do gene AGAP003695 quando se utilizam primers diferentes pode ser devida à formação de isoformas do gene, resultantes do facto de este ter um número de intrões elevado e as respectivas sequências bastante longas, mesmo assim, as variações entre mosquitos infectados e o controlo para cada ponto experimental têm um comportamento semelhante às 18 e às 24 horas para a análise com ambos os primers.

Lemos e colaboradores (1996), e também Chegue e colaboradores (1996), demonstraram que a concentração de aminopeptidases em *An. gambiae* aumenta ao longo do tempo até às 24 horas após uma refeição sanguínea, no entanto, devido ao facto de ambos os estudos se terem realizado antes do advento das técnicas modernas de biologia molecular como o qRT-PCR, não é referido qual foi a aminopeptidase estudada e, como tal, não é possível fazer uma comparação específica entre os resultados encontrados por esses autores e os resultados obtidos neste trabalho. Apesar da hipótese de que ocorre um aumento da expressão de aminopeptidases após a refeição sanguínea em *An. gambiae* ter sido sugerida por Lemos (1996), os resultados obtidos no nosso trabalho demonstram o oposto.

É de realçar também que estes trabalhos sobre variação na actividade das enzimas aminopeptidases de *An. gambiae*, apenas se debruçam na alimentação *per se* dos mosquitos, não contando com o possível efeito da invasão do epitélio por parte dos parasitas. A alimentação com refeição infectante poderia no nosso trabalho, assim,

apresentar resultados diferentes da não infectante. Tal não chegou a acontecer, já que também para a refeição infectante não houve diferenças significativas antes e após a refeição sanguínea, e também não se verificaram diferenças significativas entre os mosquitos infectados e o controlo não infectado, para cada um dos tempos de análise.

No nosso trabalho pode-se verificar, embora sem valor significativo, que os perfis de expressões dos genes são diferentes em relação ao controlo não alimentado ao longo do tempo, de gene para gene. Por exemplo no gene AGAP005728, o valor de expressão é semelhante ao longo do tempo após a refeição, no gene AGAP003077 esta expressão aumenta e no gene AGAP003695 diminui, quando se utiliza o segundo par de primers. Este facto que comprova a necessidade de um estudo individual do comportamento de cada gene, em vez de uma análise conjunta da família de genes aminopeptidase. Pode-se assim concluir que, de maneira independente, há genes aminopeptidase que podem aumentar a sua expressão ao longo do tempo, diminuí-la ou até não ter qualquer variação de expressão, após a refeição.

Em termos da importância das aminopeptidases, Rosenfeld e Vanderberg (1999) revelaram que em *An. gambiae* há uma regulação positiva destas enzimas em estirpes refractárias para *P. falciparum*, mostrando que podem, possivelmente, estar implicadas no estabelecimento da infecção. Em mosquitos da espécie *An. stephensi*, por outro lado, já foi estabelecido que os mosquitos refractários para *P. falciparum* têm concentrações residuais de aminopeptidase antes da alimentação, mais elevadas que mosquitos susceptíveis (Feldmann *et al.* 1990). No entanto, foi também demonstrado no mesmo estudo que não existem diferenças na actividade enzimática específica das aminopeptidases entre estirpes refractárias e susceptíveis, ou seja, a presença das

aminopeptidases pode conferir resistência à invasão pelos plasmódios mas a acção lítica das mesmas não parece ser o mecanismo pelo qual essa resistência é conferida.

Dinglasan e colaboradores (2007) confirmaram que um gene aminopeptidase (AGAP004809) era o ligando principal de uma molécula (jacalina) que inibe a ligação dos oocinetos na interacção oocineto-epitélio. Ao utilizar anticorpos anti-aminopeptidase foram inibidas as ligações de glicanos, o que resultou numa protecção contra a infecção do mosquito *An. gambiae* pelo plasmódio. Este gene não foi estudado no nosso trabalho. Seria interessante verificar a variação da sua expressão em resposta à infecção, já que está comprovada a sua influência na ligação do parasita ao epitélio intestinal do mosquito. Ao comparar a variação de expressão dos genes em resposta à alimentação (0 horas), os nossos resultados permitem-nos verificar que não existe aumento de expressão dos genes codificantes para aminopeptidase, tal como foi verificado também no mesmo trabalho por Dinglasan (2007) e anteriormente em *An. stephensi* por Xu (2005).

Estudos recentes revelaram uma regulação positiva de um gene de aminopeptidase de *An. gambiae* (AGAP004860) em mosquitos alimentados com uma refeição infectante de *P. berghei* contendo o fármaco cloroquina (Abrantes *et al.* 2008). Pelos resultados obtidos no nosso trabalho não pudemos relatar directamente a variação de expressão do gene referido mas, não havendo nos nossos resultados evidências de alteração da expressão dos genes aminopeptidases após a refeição infectante com *P. berghei*, pode-se afirmar que, em princípio, a variação observada foi devida sobretudo a um efeito da cloroquina na expressão do gene e não a uma influência do parasita presente na refeição sanguínea.

Pode-se então concluir o potencial valor das enzimas digestivas como ferramenta que deve continuar a ser estudada para melhor compreender a infecção dos mosquitos por parasitas de malária, sendo necessária a clarificação das várias diferenças observadas nos modelos vector-parasita, bem como investigar a actividade dos genes conhecidos para estas enzimas. De facto, a aposta nesta linha de investigação parece ser ainda insuficiente, sobretudo com o advento de novas tecnologias de expressão genética que permitem identificar genes de enzimas digestivas que podem ser expressos preferencialmente ou influenciar de sobremaneira a invasão do mosquito pelo parasita. O nosso trabalho revela-se inovador neste campo pois é o primeiro a abordar especificamente o estudo da expressão dos genes de aminopeptidase de *An. gambiae* aquando a infecção por *P. berghei* por PCR em tempo real, quando até agora estes estudos de expressão para aminopeptidases foram todos feitos através da análise de clusters de genes.

É de salientar nesta discussão que, quando o estudo foi desenhado inicialmente a base de dados de genes de *An. gambiae* disponível em www.ensembl.org, continha apenas 4 genes pertencentes à família aminopeptidase (ENSF00000001133), contudo presentemente, já se podem encontrar 15 genes com motivo aminopeptidase. A sua análise na totalidade poderia revelar resultados possivelmente diferentes e com alterações significativas da expressão ao longo do tempo, após a refeição sanguínea infectante.

O facto de terem ocorrido perturbações na extracção de RNA das experiências de alimentação artificial, devido à perda do material biológico no processo de extracção, não permitiu a concretização de um dos objectivos iniciais do trabalho, que era a comparação entre os dois tempos de penetração do epitélio intestinal de *An. gambiae* em laboratório, com *P. berghei* utilizando os dois métodos de alimentação. Uma abordagem

experimental de comparação entre os dois métodos seria interessante, tanto de um ponto de vista de obtenção de resultados, como de um ponto de vista de otimização custo/benefício para futuros trabalhos de análise de infecções.

Seria também de interesse verificar se a ausência de variação significativa da expressão dos genes se mantém às 36h e às 48h, pois estudos anteriores revelam que torna a ocorrer um aumento da actividade das aminopeptidases após esse intervalo de tempo, em *An. stephensi* (Billingsley and Hecker 1991).

É de denotar também que o estudo da variação de aminopeptidases no estômago do mosquito, aquando da infecção por parasitas de malária, teria interesse não só pela alteração de uma enzima digestiva e consequente diminuição ou aumento de quantidade de nutrientes absorvidos pelo mosquito, mas também porque uma alteração na digestão contribui activamente para a modificação do *fitness* do mosquito. Esta alteração na absorção da refeição sanguínea está relacionada com a síntese de vitelogenina e maturação ovárica, logo poderia hipoteticamente ser utilizada como ferramenta para controlo dos mosquitos como vectores de doença.

Os poucos estudos feitos sobre a acção das enzimas digestivas aminopeptidases não levaram a conclusões de aplicação prática no combate ao parasita da malária e os resultados obtidos neste trabalho também não elucidam a acção que esta enzima pode desempenhar na infecção por plasmódio. O próximo passo a seguir seria, talvez, aproveitar as optimizações obtidas neste trabalho para completar o estudo da expressão dos genes que ainda se encontram na família Aminopeptidase ENSF00000001133 de *Anopheles gambiae*. Com os resultados da expressão de todos os genes da família seria possível concluir sobre o real papel e influência das aminopeptidases nos mecanismos de infecção do parasita da malária nos mosquitos.

Bibliografia

ABRANTES, P., DIMOPOULOS, G., GROSSO, A. R., DO ROSÁRIO, V. E. and SILVEIRA, H. (2008). "Chloroquine Mediated Modulation of *Anopheles gambiae* Gene Expression." *PLoS ONE* **3**(7): e2587.

AFRANE, Y., LITTLE, T., LAWSON, B., GITHEKO, A. and YAN, G. (2008). "Deforestation and vectorial capacity of *Anopheles gambiae* Giles mosquitoes in malaria transmission, Kenya." *Emerging Infectious Diseases* **Epub ahead of print**.

BEERNTSEN, B., JAMES, A. and CHRISTENSEN, B. (2000). "Genetics of mosquito vector competence." *Microbiology and molecular biology reviews* **64**(1): 115-137.

BESANSKY, N. J., POWELL, J. R., CACCONE, A., HAMM, D. M., SCOTT, J. A. and COLLINS, F. H. (1994). "Molecular phylogeny of the *Anopheles gambiae* complex suggests genetic introgression between principal malaria vectors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(15): 6885-6888.

BILLINGSLEY, P. F. (1990). "Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): partial characterization and post-feeding activity of midgut aminopeptidases." *Arch Insect Biochem Physiol* **15**(3).

BILLINGSLEY, P. F. and HECKER, H. (1991). "Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): activity and distribution of trypsin, aminopeptidase, and alpha-glucosidase in the midgut." *Journal of Medical Entomology* **28**(6).

BOGITSH, B. and CHENG, T. (1998). *Human Parasitology 2nd Edition*, Academic Press.

BRIEGEL, H. and LEA, A. (1975). "Relationship between protein and proteolytic activity in the midgut of mosquitoes." *J Insect Physiol* **21**(9): 1597-604.

CARTER and DIGGS (1977). *Parasitic Protozoa*. New York, Academic Press.

CARTER, R. (2001). "Transmission blocking malaria vaccines." *Vaccine* **19**(17-19): 2309-2314.

CHEGE, G., PUMPUNI, C. and BEIER, J. (1996). "Proteolytic enzyme activity and *Plasmodium falciparum* sporogonic development in three species of *Anopheles* mosquitoes." *Journal of Parasitology* **82**(1): 11-16.

COETZEE, M., CRAIG, M. and SUER, D. L. (2000). "Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex." *Parasitology Today* **16**(2): 74-7.

DANA, A. N., HONG, Y. S., KERN, M. K., HILLENMEYER, M. E., HARKER, B. W., LOBO, N. F., HOGAN, J. R., ROMANS, P. and COLLINS, F. H. (2005). "Gene expression patterns associated with blood-feeding in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*." *BMC Genomics* **6**(1): 5.

DINGLASAN, R., KALUME, D., KANZOK, S., GHOSH, A., MURATOVA, O., PANDEY, A. and JACOBS-LORENA, M. (2007). "Disruption of *Plasmodium falciparum* development by antibodies against a conserved mosquito midgut antigen." *PNAS* **104**(33): 13461-13466.

EVANS, K. J., HANSEN, D. S., VAN ROOIJEN, N., BUCKINGHAM, L. A. and SCHOFIELD, L. (2006). "Severe malarial anemia of low parasite burden in rodent models results from accelerated clearance of uninfected erythrocytes." *Blood* **107**(3): 1192-1199.

FELDMANN, A. M., BILLINGSLEY, P. F. and SAVELKOUL, E. (1990). "Bloodmeal digestion by strains of *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae) of differing susceptibility to *Plasmodium falciparum*." *Parasitology* **101**: 193-200.

GASS, R. and YEATES, R. (1979). "In vitro damage of cultured ookinetes of *Plasmodium gallinaceum* by digestive proteinases from susceptible *Aedes aegypti*." *Acta Tropica* **36**: 243-252.

GUIYEDI, V., CHANSEAUD, Y., *et al.* (2007). "Self-reactivities to the non-erythroid alpha spectrin correlate with cerebral malaria in Gabonese children." *PLoS ONE* **2**(4): e389.

HOLT, R. A., SUBRAMANIAN, G. M., *et al.* (2002). "The Genome Sequence of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*." *Science* **298**(5591): 129-149.

HUBBARD, T. J. P., AKEN, B. L., *et al.* (2006). "Ensembl 2007." *Nucl. Acids Res.*: gkl996.

JAHAN, N., DOCHERTY, P. T., BILLINGSLEY, P. F. and HURD, H. (1999). "Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi*: the effects of *Plasmodium yoelii nigeriensis* on midgut enzyme activities." *Parasitology* **119**(6).

JANSE, C. J., MONS, B., ROUWENHORST, R. J., KLOOSTER, P. F. V. D., OVERDULVE, J. and VAN DER KAAAY, H. (1985). "In vitro formation of ookinetes and functional maturity of *Plasmodium berghei* gametocytes." *Parasitology* **91**: 19-29.

KESHAVARZ-VALIAN, H., ALGER, N. E. and BOISSONNEAULT, G. A. (1985). "Effects of p-Aminobenzoic Acid, Methionine, Threonine and Protein Levels on Susceptibility of Mice to Plasmodium berghei." *J. Nutr.* **115**(12): 1613-1620.

LANDAU, I. and BOULARD, Y. (1978). *Life cycles and morphology in rodent malaria*. London, Academic Press.

LEANE, M. and BILLINGSLEY, P. (1996). *Biology of the insect midgut*, Chapman & Halle.

LEHANE, M. and BILLINGSLEY, P. (1996). *Biology of the insect midgut*, Chapman & Halle.

LEHANE, M. J. (1997). "Peritrophic Matrix Structure and Function." *Annual Review of Entomology* **42**(1): 525-550.

LEMOIS, F. J., CORNEL, A. J. and JACOBS-LORENA, M. (1996). "Trypsin and aminopeptidase gene expression is affected by age and food composition in Anopheles gambiae." *Insect Biochem Mol Biol* **26**(7): 651-8.

MULLER, H. M., CRAMPTON, J. M., DELLA TORRE, A., SINDEN, R. and CRISANTI, A. (1993). "Members of a trypsin gene family in Anopheles gambiae are induced in the gut by blood meal." *Embo J* **12**(7): 2891-900.

NCHINDA, T. (1998). "Malaria: A reemerging disease in Africa." *Emerging Infectious Diseases* **4**(3).

NDIATH, M., BRENGUES, C., KONATE, L., SOKHNA, C., BOUDIN, C., TRAPE, J. and FONTENILLE, D. (2008). "Dynamics of transmission of Plasmodium falciparum by Anopheles arabiensis and the molecular forms M and S of Anopheles gambiae in Dielmo, Senegal." *Malaria Journal* **7**(1): 136.

NORIEGA, F., EDGAR, K., BECHET, R. and WELLS, M. (2002). "Midgut exopeptidase activities in Aedes aegypti are induced by blood feeding." *Journal of Insect Physiology* **48**: 205-212.

PALMER, T. (1995). *Understanding Enzymes, 4th Edition*, Prentice Hall.

RICHARDS, A. G. and RICHARDS, P. A. (1977). "The Peritrophic Membranes of Insects." *Annual Review of Entomology* **22**(1): 219-240.

RODRIGUEZ, M. C., MARGOS, G., COMPTON, H., KU, M., LANZ, H., RODRIGUEZ, M. H. and SINDENA, R. E. (2002). "Plasmodium berghei: routine production of pure gametocytes, extracellular gametes, zygotes, and ookinetes." *Experimental Parasitology* **101**: 73-76.

SATTABONGKOT, J., MANEECHAI, N., PHUNKITCHAR, V., EIKARAT, N., KHUNTIRAT, B., SIRICHAISINTHOP, J., BURGE, R. and COLEMAN, R. E. (2003). "Comparison of artificial membrane feeding with direct skin feeding to estimate the infectiousness of *Plasmodium vivax* gametocyte carriers to mosquitoes." *Am J Trop Med Hyg* **69**(5): 529-535.

SERVICE, M. W. (1980). *A guide to Medical Entomology*. Londres, Chapman & Hall.

SHAHABUDDIN, M. (1998). "Plasmodium ookinete development in the mosquito midgut: a case of reciprocal manipulation." *Parasitology* **116**: 83-93.

SILVER, J. B. (2008). *Mosquito Ecology, Field Sampling Methods 3rd edition*, Springer.

SINDEN, R. E. (2002). "Molecular interactions between *Plasmodium* and its insect vectors." *Cellular Microbiology* **4**(11): 713-724.

TAKKEN, W., ELING, W., HOOGHOF, J., DEKKER, T., HUNT, R. and COETZEE, M. (1999). "Susceptibility of *Anopheles quadriannulatus* Theobald (Diptera: Culicidae) to *Plasmodium falciparum*." *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **93**(6): 578-80.

TAYLOR, A. (1993). "Aminopeptidases: structure and function." *Faseb J* **7**(2): 290-8.

WARR, E., AGUILAR, R., DONG, Y., MAHAIRAKI, V. and DIMOPOULOS, G. (2007). "Spatial and sex-specific dissection of the *Anopheles gambiae* midgut transcriptome." *BMC Genomics* **8**(37).

WEISS, M. M. and VANDERBERG, J. P. (1977). "Studies on *Plasmodium* ookinetes: II. In vitro formation of *Plasmodium berghei* ookinetes." *J Parasitol* **63**: 932-934.

WERNSDORFER, W. H. and MCGREGOR, I. A. (1988). *Principles and Practice of Malariology*. Edinburgh, Churchill Livingstone.

World Health Organization (2008). *World Malaria Report 2008*.

XU, X., DONG, Y., *et al.* (2005). "Transcriptome analysis of *Anopheles stephensi*-*Plasmodium berghei* interactions " *Molecular and Biochemical Parasitology* **142**(1).

Anexos:

II Protocolo de manutenção das colónias de *Anopheles gambiae*

| 2ª Feira | 3ª Feira | 4ª Feira | 5ª Feira | 6ª Feira |
|-------------------------------|----------|-----------------------------|-------------------------------|--|
| Recolha e passagem de ovos | | Recolha e passagem de pupas | Recolha e passagem de ovos | Recolha e passagem de ovos (se houver) |
| Preparação para a alimentação | | | Preparação para a alimentação | |
| Alimentação de adultos | | Alimentação de larvas | Alimentação de adultos | Recolha e passagem de pupas |
| Recolha e passagem de pupas | | | Recolha e passagem de pupas | Alimentação de larvas |
| Alimentação de larvas | | | Alimentação de larvas | |

Informações adicionais:

- Os mosquitos são mantidos num ritmo circadiano 12h/12h de luz/escuro.
- A alimentação de adultos faz-se por ratos infectados com uma solução inoculada intramuscularmente de 1:1 de Ketamina (Imalgene®) e Cloridrato de Xilazina (Rompum®), 80mg/Kg.
- Os adultos são mantidos numa gaiola stock, onde se alimentam, e numa gaiola de eclosão, para onde se colocam as pupas. Os adultos, entre alimentações, são mantidos com uma solução de Frutose 10%.
- As larvas são mantidas em tinas que contêm cerca de 5cm de altura de água destilada com 0,02% de hidrogenocarbonato de sódio. As larvas são alimentadas com comida comercial de peixe triturada, contendo menos de 10% de gordura.
- Este protocolo é semelhante para *Anopheles stephensi*, apenas com a diferença que as alimentações sanguíneas são feitas de 20 em 20 dias, ou quando há necessidade de mosquitos.

II - Soluções

- Meio de cultura de oocinetos incompleto (RPMI):

- 1 frasco de RPMI (Sigma® p-4130=

- 2g de bicarbonato de sódio

- 0,05g de hipoxantina (0,005%)

- 1L de água destilada

- Completar com:

- FCS (Fetal Calf Serum) inativado a 1:10

- PSN (Penicilina, 50mg/L; Streptomicina, 50mg/L; Neomicina, 100mg/L) 1:1000

- Inativar o FCS:

- 56°C durante uma hora

- Meio de coloração, segundo Giemsa:

- solução 1:10 de azul de Giemsa (Riedel-Hans®) em água tamponada

- Solução de inoculação de Fenilhidrazina, 6mg/ml em NaCl 0,9%:

- 0,06g de fenilhidrazina

- 0,09g de cloreto de sódio (NaCl)

- 10ml de água destilada

- PABA:

- 0,5g de ácido 4-aminobenzóico diluído em 1L de água destilada

- PBS (5L):

- 40g cloreto de sódio (NaCl)

- 5,75g de fosfato de sódio (NaH_2PO_4)

- 1g de cloreto de potássio (KCl)

- 1g de hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)

- completar até 5 litros e acertar o pH para 7,4

III - Quadro ilustrativo dos valores obtidos no programa iCycler™ (Biorad, California):

PCR Standard Curve Report PCR Base Line Subtracted Curve Fit Data

Current Date: **23-Sep-08 02:21**
 Data generated on: **31-Jul-08 at 11:52 .**

Optical data file name: **Data 31-Jul-08 5728hs.opd**
 Plate Setup file used: **30.7.20085728.pts**
 Protocol file used: **Carlos.tmo**

Sample volume: **20,00 ul**
 Hot Start? **Não**
 Well factor collection: **Experimental Plate**

Protocol

Cycle 1: (1X)
 Step 1: **95,0°C** **for 10:00**

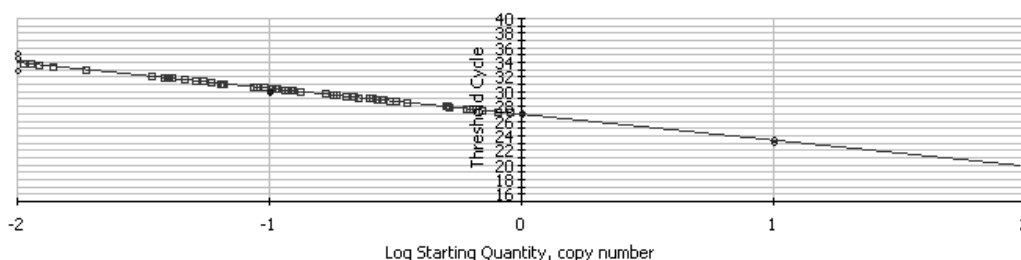
Cycle 2: (40X)
 Step 1: **95,0°C** **for 00:30**
 Step 2: **62,0°C** **for 01:00**
 Data collection enabled.

Cycle 3: (80X)
 Step 1: **60,0°C** **for 00:10**
 Increase setpoint temperature after cycle 2 by 0,5°C
 Melt curve data collection and analysis enabled.

Standard Curve Graph for FAM-490

Correlation Coefficient: 0,994 Slope: -3,529 Intercept: 26,920 $Y = -3,529 X + 26,920$
 PCR Efficiency: 92,0 %

□ Unknowns
 ○ Standards



Data Analysis Parameters

Calculated threshold has been replaced by the user selected threshold **98,3**.
 User selected baseline cycles are **2 to 16**.
 Data analysis window is set at **95,00%** of a cycle, centered at **end** of the cycle.
Weighted Mean digital filtering has been applied. Global filtering is **off**.

Standard Curve Spreadsheet Data for FAM-490 Units: copy number

| | Type | Identifier | Rep | Ct | Log | SQ | SQ | SQ | Ct | Ct |
|-----|----------|------------|-----|-------|-----|----------|----------|----------|-------|----------|
| | | | | | SQ | | Mean | SD | Mean | SD |
| A04 | Standard | s7 | 1 | 19,97 | 2 | 1,00E+02 | 1,00E+02 | 0,00E+00 | 20,12 | 2,03E-01 |
| A05 | Standard | s7 | 1 | 20,35 | 2 | 1,00E+02 | 1,00E+02 | 0,00E+00 | 20,12 | 2,03E-01 |
| A06 | Standard | s7 | 1 | 20,05 | 2 | 1,00E+02 | 1,00E+02 | 0,00E+00 | 20,12 | 2,03E-01 |
| A07 | Standard | s7 | 2 | 23,38 | 1 | 1,00E+01 | 1,00E+01 | 0,00E+00 | 23,27 | 1,79E-01 |
| A08 | Standard | s7 | 2 | 23,36 | 1 | 1,00E+01 | 1,00E+01 | 0,00E+00 | 23,27 | 1,79E-01 |
| A09 | Standard | s7 | 2 | 23,07 | 1 | 1,00E+01 | 1,00E+01 | 0,00E+00 | 23,27 | 1,79E-01 |
| A10 | Standard | s7 | 3 | 26,82 | 0 | 1,00E+00 | 1,00E+00 | 0,00E+00 | 26,71 | 9,79E-02 |
| A11 | Standard | s7 | 3 | 26,68 | 0 | 1,00E+00 | 1,00E+00 | 0,00E+00 | 26,71 | 9,79E-02 |
| A12 | Standard | s7 | 3 | 26,64 | 0 | 1,00E+00 | 1,00E+00 | 0,00E+00 | 26,71 | 9,79E-02 |
| B01 | Standard | s7 | 4 | 30,06 | -1 | 1,00E-01 | 1,00E-01 | 6,97E-10 | 30,28 | 2,71E-01 |

| | | | | | | | | | | |
|-----|----------|--------|----|-------|--------|----------|----------|----------|-------|----------|
| B02 | Standard | s7 | 4 | 30,58 | -1 | 1,00E-01 | 1,00E-01 | 6,97E-10 | 30,28 | 2,71E-01 |
| B03 | Standard | s7 | 4 | 30,2 | -1 | 1,00E-01 | 1,00E-01 | 6,97E-10 | 30,28 | 2,71E-01 |
| B04 | Standard | s7 | 5 | 33,9 | -2 | 1,00E-02 | 1,00E-02 | 8,78E-11 | 34,07 | 4,48E-01 |
| B05 | Standard | s7 | 5 | 33,73 | -2 | 1,00E-02 | 1,00E-02 | 8,78E-11 | 34,07 | 4,48E-01 |
| B06 | Standard | s7 | 5 | 34,58 | -2 | 1,00E-02 | 1,00E-02 | 8,78E-11 | 34,07 | 4,48E-01 |
| B07 | Unknown | I 0h | 1 | 21,65 | 1,502 | 3,17E+01 | 3,28E+01 | 1,05E+00 | 21,6 | 4,84E-02 |
| B08 | Unknown | I 0h | 1 | 21,59 | 1,517 | 3,29E+01 | 3,28E+01 | 1,05E+00 | 21,6 | 4,84E-02 |
| B09 | Unknown | I 0h | 1 | 21,55 | 1,529 | 3,38E+01 | 3,28E+01 | 1,05E+00 | 21,6 | 4,84E-02 |
| B10 | Unknown | I 12i | 2 | 21,09 | 1,662 | 4,59E+01 | 4,32E+01 | 3,86E+00 | 21,19 | 1,36E-01 |
| B12 | Unknown | I 12i | 2 | 21,28 | 1,607 | 4,05E+01 | 4,32E+01 | 3,86E+00 | 21,19 | 1,36E-01 |
| C01 | Unknown | I 12c | 3 | 21,68 | 1,493 | 3,11E+01 | 3,12E+01 | 5,50E-01 | 21,68 | 2,67E-02 |
| C02 | Unknown | I 12c | 3 | 21,7 | 1,486 | 3,07E+01 | 3,12E+01 | 5,50E-01 | 21,68 | 2,67E-02 |
| C03 | Unknown | I 12c | 3 | 21,65 | 1,502 | 3,17E+01 | 3,12E+01 | 5,50E-01 | 21,68 | 2,67E-02 |
| C04 | Unknown | I 18i | 4 | 22,28 | 1,322 | 2,10E+01 | 2,02E+01 | 2,53E+00 | 22,35 | 1,96E-01 |
| C05 | Unknown | I 18i | 4 | 22,19 | 1,346 | 2,22E+01 | 2,02E+01 | 2,53E+00 | 22,35 | 1,96E-01 |
| C06 | Unknown | I 18i | 4 | 22,57 | 1,239 | 1,73E+01 | 2,02E+01 | 2,53E+00 | 22,35 | 1,96E-01 |
| C07 | Unknown | I 18c | 5 | 22,36 | 1,297 | 1,98E+01 | 2,02E+01 | 8,35E-01 | 22,34 | 6,22E-02 |
| C08 | Unknown | I 18c | 5 | 22,38 | 1,291 | 1,96E+01 | 2,02E+01 | 8,35E-01 | 22,34 | 6,22E-02 |
| C09 | Unknown | I 18c | 5 | 22,27 | 1,325 | 2,11E+01 | 2,02E+01 | 8,35E-01 | 22,34 | 6,22E-02 |
| C10 | Unknown | I24i | 6 | 24,97 | 0,551 | 3,56E+00 | 3,95E+00 | 3,94E-01 | 24,81 | 1,52E-01 |
| C11 | Unknown | I24i | 6 | 24,67 | 0,638 | 4,34E+00 | 3,95E+00 | 3,94E-01 | 24,81 | 1,52E-01 |
| C12 | Unknown | I24i | 6 | 24,8 | 0,598 | 3,97E+00 | 3,95E+00 | 3,94E-01 | 24,81 | 1,52E-01 |
| D01 | Unknown | I24c | 7 | 23,74 | 0,903 | 8,00E+00 | 7,69E+00 | 4,20E-01 | 23,8 | 8,40E-02 |
| D02 | Unknown | I24c | 7 | 23,77 | 0,895 | 7,84E+00 | 7,69E+00 | 4,20E-01 | 23,8 | 8,40E-02 |
| D03 | Unknown | I24c | 7 | 23,9 | 0,858 | 7,21E+00 | 7,69E+00 | 4,20E-01 | 23,8 | 8,40E-02 |
| D04 | Unknown | II0h | 8 | 20,94 | 1,704 | 5,06E+01 | 5,39E+01 | 4,27E+00 | 20,85 | 1,18E-01 |
| D05 | Unknown | II0h | 8 | 20,89 | 1,72 | 5,25E+01 | 5,39E+01 | 4,27E+00 | 20,85 | 1,18E-01 |
| D06 | Unknown | II0h | 8 | 20,72 | 1,769 | 5,87E+01 | 5,39E+01 | 4,27E+00 | 20,85 | 1,18E-01 |
| D07 | Unknown | II12i | 9 | 31,81 | -1,41 | 3,89E-02 | 4,49E-02 | 9,64E-03 | 31,62 | 3,10E-01 |
| D08 | Unknown | II12i | 9 | 31,26 | -1,252 | 5,60E-02 | 4,49E-02 | 9,64E-03 | 31,62 | 3,10E-01 |
| D09 | Unknown | II12i | 9 | 31,78 | -1,402 | 3,96E-02 | 4,49E-02 | 9,64E-03 | 31,62 | 3,10E-01 |
| D10 | Unknown | II12c | 10 | 21,74 | 1,476 | 2,99E+01 | 2,96E+01 | 6,13E-01 | 21,76 | 3,16E-02 |
| D11 | Unknown | II12c | 10 | 21,79 | 1,461 | 2,89E+01 | 2,96E+01 | 6,13E-01 | 21,76 | 3,16E-02 |
| D12 | Unknown | II12c | 10 | 21,74 | 1,477 | 3,00E+01 | 2,96E+01 | 6,13E-01 | 21,76 | 3,16E-02 |
| E01 | Unknown | II18i | 11 | 21,07 | 1,669 | 4,67E+01 | 4,61E+01 | 2,01E+00 | 21,09 | 6,68E-02 |
| E02 | Unknown | II18i | 11 | 21,16 | 1,642 | 4,38E+01 | 4,61E+01 | 2,01E+00 | 21,09 | 6,68E-02 |
| E03 | Unknown | II18i | 11 | 21,03 | 1,679 | 4,77E+01 | 4,61E+01 | 2,01E+00 | 21,09 | 6,68E-02 |
| E04 | Unknown | II18c | 12 | 22,93 | 1,136 | 1,37E+01 | 1,46E+01 | 8,30E-01 | 22,83 | 8,74E-02 |
| E05 | Unknown | II18c | 12 | 22,77 | 1,182 | 1,52E+01 | 1,46E+01 | 8,30E-01 | 22,83 | 8,74E-02 |
| E06 | Unknown | II18c | 12 | 22,79 | 1,175 | 1,50E+01 | 1,46E+01 | 8,30E-01 | 22,83 | 8,74E-02 |
| E07 | Unknown | II24i | 13 | 20,66 | 1,786 | 6,11E+01 | 6,01E+01 | 1,42E+00 | 20,68 | 3,60E-02 |
| E08 | Unknown | II24i | 13 | 20,67 | 1,784 | 6,08E+01 | 6,01E+01 | 1,42E+00 | 20,68 | 3,60E-02 |
| E09 | Unknown | II24i | 13 | 20,72 | 1,767 | 5,85E+01 | 6,01E+01 | 1,42E+00 | 20,68 | 3,60E-02 |
| E10 | Unknown | II24c | 14 | 23,1 | 1,086 | 1,22E+01 | 1,23E+01 | 1,65E-01 | 23,09 | 2,03E-02 |
| E11 | Unknown | II24c | 14 | 23,1 | 1,086 | 1,22E+01 | 1,23E+01 | 1,65E-01 | 23,09 | 2,03E-02 |
| E12 | Unknown | II24c | 14 | 23,07 | 1,096 | 1,25E+01 | 1,23E+01 | 1,65E-01 | 23,09 | 2,03E-02 |
| F01 | Unknown | III0h | 15 | 20,17 | 1,925 | 8,41E+01 | 1,01E+02 | 1,49E+01 | 19,91 | 2,33E-01 |
| F02 | Unknown | III0h | 15 | 19,72 | 2,054 | 1,13E+02 | 1,01E+02 | 1,49E+01 | 19,91 | 2,33E-01 |
| F03 | Unknown | III0h | 15 | 19,85 | 2,018 | 1,04E+02 | 1,01E+02 | 1,49E+01 | 19,91 | 2,33E-01 |
| F04 | Unknown | III12i | 16 | 21,8 | 1,458 | 2,87E+01 | 2,98E+01 | 1,34E+00 | 21,74 | 6,78E-02 |
| F05 | Unknown | III12i | 16 | 21,67 | 1,496 | 3,13E+01 | 2,98E+01 | 1,34E+00 | 21,74 | 6,78E-02 |
| F06 | Unknown | III12i | 16 | 21,76 | 1,471 | 2,96E+01 | 2,98E+01 | 1,34E+00 | 21,74 | 6,78E-02 |

| | | | | | | | | | | |
|------------|---------|--------|----|-------|--------|----------|----------|----------|-------|----------|
| F07 | Unknown | III12c | 17 | 21,35 | 1,588 | 3,87E+01 | 3,75E+01 | 1,78E+00 | 21,4 | 7,30E-02 |
| F08 | Unknown | III12c | 17 | 21,37 | 1,583 | 3,83E+01 | 3,75E+01 | 1,78E+00 | 21,4 | 7,30E-02 |
| F09 | Unknown | III12c | 17 | 21,48 | 1,549 | 3,54E+01 | 3,75E+01 | 1,78E+00 | 21,4 | 7,30E-02 |
| F10 | Unknown | III18i | 18 | 21 | 1,688 | 4,87E+01 | 4,65E+01 | 3,15E+00 | 21,07 | 1,05E-01 |
| F11 | Unknown | III18i | 18 | 21,19 | 1,633 | 4,29E+01 | 4,65E+01 | 3,15E+00 | 21,07 | 1,05E-01 |
| F12 | Unknown | III18i | 18 | 21,03 | 1,681 | 4,79E+01 | 4,65E+01 | 3,15E+00 | 21,07 | 1,05E-01 |
| G01 | Unknown | III18c | 19 | 27,97 | -0,308 | 4,92E-01 | 5,41E-01 | 4,86E-02 | 27,83 | 1,37E-01 |
| G02 | Unknown | III18c | 19 | 27,82 | -0,265 | 5,43E-01 | 5,41E-01 | 4,86E-02 | 27,83 | 1,37E-01 |
| G03 | Unknown | III18c | 19 | 27,69 | -0,23 | 5,89E-01 | 5,41E-01 | 4,86E-02 | 27,83 | 1,37E-01 |
| G04 | Unknown | III24i | 20 | 20,48 | 1,838 | 6,88E+01 | 6,48E+01 | 3,61E+00 | 20,57 | 8,36E-02 |
| G05 | Unknown | III24i | 20 | 20,6 | 1,804 | 6,36E+01 | 6,48E+01 | 3,61E+00 | 20,57 | 8,36E-02 |
| G06 | Unknown | III24i | 20 | 20,64 | 1,791 | 6,18E+01 | 6,48E+01 | 3,61E+00 | 20,57 | 8,36E-02 |
| G07 | Unknown | III24c | 21 | 19,98 | 1,979 | 9,52E+01 | 1,02E+02 | 1,01E+01 | 19,88 | 1,50E-01 |
| G08 | Unknown | III24c | 21 | 19,77 | 2,04 | 1,10E+02 | 1,02E+02 | 1,01E+01 | 19,88 | 1,50E-01 |
| B11 | Unknown | I 12i | 2 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| G09 | Unknown | III24c | 21 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |

Wells Excluded from Analysis

A total of 10 well(s) have been excluded from analysis.

A01: s7

A05: 5728

C07: I 18c

C10: I24i

C11: I24i

C12: I24i

F05: III12i

F07: III12c

G01: III18c

G08: III24c

Modified Well Contents

Units have not been modified. Original units were copy number.

No wells have been modified.